# NIEDERMOLEKULARE INHALTSSTOFFE MIT IMMUNSTIMULIERENDEN EIGENSCHAFTEN AUS UNCARIA TOMENTOSA, OKOUBAKA AUBREVILLEI UND ANDEREN DROGEN

BARBARA KREUTZKAMP

Diss
München
1984

# Niedermolekulare Inhaltsstoffe mit immunstimulierenden Eigenschaften aus Uncaria tomentosa, Okoubaka aubrevillei und anderen Drogen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Barbara Kreutzkamp

aus

Hamburg

Mai 1984

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. E i d e n

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1984

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Meinen Eltern gewidmet

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S


Seite

E I N L E I T U N G . . . . . 1

KAPITEL 1:

Niedermolekulare Pflanzeninhaltsstoffe und aus der Volksmedizin bekannte Drogen mit immunstimulierenden Eigenschaften . . . . . 2

1. Immunstimulantien (Immunmodulatoren) . . . . . 2

2. Niedermolekulare Naturstoffe mit Einfluß auf bestimmte Immunparameter . . . . . 4

2.1. Aristolochiasäure . . . . . 5

2.2. Weitere niedermolekulare Verbindungen mit stimulierender Wirkung auf das Immunsystem . . . . . 9

3. Auswahl von Drogen und Verbindungsklassen für immunologische Untersuchungen . . . . . 13

KAPITEL 2:

Pharmakologische Screening-Methoden . . . . . 19

1. Granulozytentest modifiziert nach BRANDT . . . 19

2. Chemilumineszenztest . . . . . 20

2.1. Chemilumineszenz (CL) von phagozytierenden Zellen 20

2.2. Meßmethode . . . . . 21

3. Carbon-Clearance-Test (CCT) nach BIOZZI . . . . . 22

4. Lymphozytentransformationstest . . . . . 22

5. Prüfung auf Cytotoxizität durch den $^{3}$H-Thymidin-Einbautest an Asciteszellen . . . . . 23

KAPITEL 3:

Eigene Erfahrungen bei der Durchführung und Auswertung der Teste . . . . . 24

1. Vorbereitung der Proben für immunologische Untersuchungen . . . . . 24

2. Reproduzierbarkeit, Genauigkeit und Aussagekraft des Granulozytentestes . . . . . 25

3. Chemilumineszenztest . . . . . 25

3.1. Durchführung des Tests . . . . . 25

3.2. Anwendung der CL-Methode und Vergleich mit dem Granulozytentest . . . . . 27
3.2.1. Drogenextrakte . . . . . 27
3.2.2. Reinsubstanzen . . . . . 28
3.2.2.1. Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit der Granulozyten- und Vollblut-Methode . . . . . 28
3.2.2.2. Vergleich der CL-Methode mit dem Granulozytentest . . . . . 29
4. Carbon-Clearance-Screening-Untersuchungen . . . . 33
5. Cytotoxizität und Phagozytosesteigerung . . . . . 33

KAPITEL 4:

Phytochemische und immunologische Untersuchungen von Uncaria tomentosa WILLD. . . . . 36
A. Allgemeine Übersicht . . . . . 36
1. Medizinische Verwendung und bisherige pharmakologische Untersuchungen von Uncaria-Drogen . . 36
2. Vorkommen und botanische Beschreibung von Uncaria tomentosa . . . . . 37
3. Bisher bekannte Inhaltsstoffe aus Uncaria tomentosa . . . . . 38

B. Isolierung und Identifizierung der Wurzelalkaloide von Uncaria tomentosa (braune Varietät) . . . . . 40
1. Lokalisierung des immunologischen Wirkprinzips von Uncaria tomentosa . . . . . 40
2. Gewinnung des Rohalkaloidgemisches, dünnschichtchromatographische Untersuchung . . . . . 40
3. Isolierung der Alkaloide . . . . . 42
3.1. Säulenchromatographie des Rohalkaloids . . . 42
3.2. Präparative Schichtchromatographie von A1 -A4 43
4. Identifizierung der isolierten Alkaloide . . . 43
4.1. Massen- und UV-Spektren . . . . . 43
4.2. Isomerisierung der isolierten Alkaloide . . . 47
4.3. Identifizierung der isolierten Alkaloide . . 50

Seite

C. DC- und HPLC-Screening südamerikanischer Uncaria-Pflanzen . . . . . 53
1. Bisherige Analytik von Uncaria-Alkaloiden . . . 53
2. Ionenpaarchromatographie von Uncaria-Alkaloiden 54
3. Qualitatives und quantitatives Alkaloid-Screening von Uncaria-Arten . . . . . 57
3.1. DC-Screening . . . . . 57
3.2. HPLC-Screening . . . . . 59
4. Zusammenfassung und Diskussion der Screening-Untersuchungen . . . . . 64

D. Immunologische Untersuchungen . . . . . 65
1. Granulozyten- und Chemilumineszenz-Test . . . . 65
1.1. Lokalisation des Wirkprinzips, Untersuchung der Alkaloide . . . . . 65
1.2. Immunologische Screening-Untersuchung verschiedener südamerikanischer Uncaria-Arten . 70
2. In-vivo-Untersuchungen: Carbon-Clearance-Test, Prüfung auf immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung . . . . . 71
3. Lymphozytentransformationstest . . . . . 75
4. Akute Toxizität, Cytotoxizität und Antitumorwirkung . . . . . 75
5. Zusammenfassung und Diskussion der immunologischen Untersuchungen . . . . . 78

KAPITEL 5:
Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Okoubaka aubrevillei PELLEG. u. NORMAND. . . . . 79
A. Allgemeine Übersicht . . . . . 79
1. Volksmedizinische Anwendung der Droge . . . . . 79
2. Botanik . . . . . 79
2.1. Systematik . . . . . 79
2.2. Vorkommen und Beschreibung der Pflanze . . . 80
2.3. Pharmakognostische Untersuchung der Stammrinde . . . . . 80

B. Phytochemische Untersuchungen . . . . . 83
1. Untersuchung des Inhaltsstoffmusters . . . . . 83

Seite

2. Nähere Charakterisierung einiger Inhaltsstoffe 85
2.1. "Alkaloide" . . . . . 85
2.1.1. Gewinnung und DC-Untersuchung eines "Rohalkaloidgemisches" . . . . . 85
2.1.2. Präparative Auftrennung des "Alkaloidgemisches" durch Schichtchromatographie . . . 88
2.1.3. Reinigung der isolierten "Alkaloide" durch präparative HPLC . . . . . 88
2.2. Aminosäuren und Peptide . . . . . 90
2.3. Gerbstoffe . . . . . 91
2.3.1. Catechine . . . . . 91
2.3.2. Tannine . . . . . 93
2.4. Sterine, Sterinester und Lipide . . . . . 94
2.4.1. Sterine . . . . . 94
2.4.2. Sterinester und Lipide . . . . . 94

C. Pharmakologische Untersuchungen . . . . . 95
1. Akute Toxizität . . . . . 95
2. Mikrobiologische Untersuchungen . . . . . 95
3. Leberschutzwirkung im Hepatozytentest . . . . . 96
4. Immunologische Untersuchungen . . . . . 97

D. Zusammenfassung und Diskussion der in Kapitel 4 erhaltenen Ergebnisse . . . . . 100

KAPITEL 6:

Immunologisches Screening niedermolekularer Pflanzeninhaltsstoffe . . . . . 101
1. Alkaloide . . . . . 101
1.1. Im Granulozytentest wirksame Alkaloide . . . . . 101
1.2. Im Granulozytentest unwirksame Alkaloide . . . . 105
2. Untersuchung weiterer niedermolekularer Verbindungen . . . . . 106
2.1. Polyphenole, Chinone, Pflanzensäuren . . . . . 106
2.2. Terpene . . . . . 107
3. Diskussion der in Kapitel 6 erhaltenen Ergebnisse 107

Z U S A M M E N F A S S U N G . . . . . 109

Seite


EXPERIMENTELLER TEIL . . . . . 111
I. Herkunft der Drogen und Vergleichssubstanzen . . . 111
1. Herkunft der Drogen . . . . . 111
1.1. Uncaria-Arten . . . . . 111
1.2. Okoubaka aubrevillei . . . . . 111
2. Herkunft der Vergleichssubstanzen für die phytochemischen Arbeiten . . . . . 111
2.1. Uncaria tomentosa . . . . . 111
2.2. Okoubaka aubrevillei . . . . . 112
3. Herkunft der Substanzen für immunologische Untersuchungen . . . . . 112
II. Phytochemische Bearbeitung von Uncaria tomentosa . 113
1. Allgemeine Arbeitsmethoden . . . . . 113
1.1. Gewinnung der Rohalkaloide . . . . . 113
1.2. Herstellung von Mazeraten für pharmakologische Testungen . . . . . 113
1.3. Hydrochlorid-Darstellung der Alkaloide für pharmakologische Testungen . . . . . 113
1.4. Fällungsreagens für Alkaloide . . . . . 114
1.5. Nachweis von Alkaloid-N-Oxiden in Methanol-Extrakten . . . . . 114
1.6. DC-Verfahren . . . . . 115
1.7. Säulenchromatographie . . . . . 118
1.8. Analytische Ionenpaarchromatographie . . . . 118
1.9. Physikalisch-chemische Untersuchungen . . . . 119
2. Spezielle Arbeitsmethoden . . . . . 120
2.1. Gewinnung des Rohalkaloids . . . . . 120
2.2. Säulenchromatographie . . . . . 120
2.3. Präparative Schichtchromatographie . . . . . 121
2.4. Isomerisierung von A1, A2 und A3 . . . . . 122
2.5. Identifizierung der isolierten Alkaloide . . 122
2.6. HPLC von Uncaria-Alkaloiden ohne Zusatz von PIC-Reagens . . . . . 124
2.7. Alkaloidanalyse durch Ionenpaarchromatographie 125
2.8. Bindung des Uncaria-Gesamtalkaloids an Catechingerbstoff nach OKUDA . . . . . 125

Seite

III. Phytochemische Bearbeitung von Okoubaka aubrevillei 126
1. Allgemeine Arbeitsmethoden . . . . . 126
1.1. DC-Verfahren . . . . . 126
1.2. Fällungsreagentien für Alkaloide . . . . . 129
1.3. Säulenchromatographie . . . . . 129
1.4. HPLC . . . . . 130
1.5. Physikalisch-chemische Untersuchungen . . . . 130
1.6. Herstellen von Extrakten für pharmakologische Testungen . . . . . 130
2. Spezielle Arbeitsmethoden . . . . . 130
2.1. "Alkaloide" . . . . . 130
2.2. Aminosäuren . . . . . 132
2.3. Gerbstoffe . . . . . 133
2.4. Sterine und Sterinester . . . . . 136

IV. Pharmakologische Untersuchungen . . . . . 137
1. Granulozytentest modifiziert nach BRANDT . . . 137
1.1. Testdurchführung . . . . . 137
1.2. Berechnung des relativen Variationskoeffizienten $V_r$ (%) . . . . . 138
2. Chemilumineszenz-Test . . . . . 139
2.1. Geräte . . . . . 139
2.2. Testdurchführung . . . . . 139
2.3. Berechnung des relativen Variationskoeffizienten $V_r$ (%) . . . . . 141
3. Carbon-Clearance-Test nach BIOZZI . . . . . 142
4. $^3$H-Thymidin-Einbautest an Asciteszellen zur Prüfung auf Cytotoxizität . . . . . 143
4.1. Testdurchführung . . . . . 143
4.2. Relativierung der Testergebnisse . . . . . 144
5. Akute Toxizität . . . . . 144
6. Mikrobiologische Untersuchungen . . . . . 145
6.1. Durchführung des Agardilutionstests zur Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration . . 145
6.2. Untersuchte Substanzen . . . . . 146
6.3. Verwendete Teststämme . . . . . 146
A N H A N G . . . . . 147
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S . . . . . 148

# E I N L E I T U N G

Trotz großer Fortschritte in der Therapie von Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen durch Antibiotika und Cytostatika haben therapieresistente Infektionskrankheiten und opportunistische Infektionen zugenommen.

Wir verfügen über wenig brauchbare Virustatika und die Therapie mit Cytostatika ist mit dem Handicap der hiermit zwangsläufig verbundenen Immunsuppression belastet.

Diese Situation hat zu einer intensiven Suche nach alternativen bzw. adjuvatorischen Behandlungsmethoden geführt. Ein Behandlungskonzept, früher unter dem Begriff der Reiz- und Umstimmungstherapie, heute als Immunstimulation bekannt, ist daher wieder aktuell geworden.

Nachdem sich in Untersuchungen des eigenen Arbeitskreises und auch japanischer Laboratorien bestimmte Polymerverbindungen (Polysaccharide, Proteine, Glycoproteine) als potentielle Immunstimulatoren erwiesen haben, sollte in der vorliegenden Arbeit ein erster Versuch unternommen werden, im Pflanzenreich auch nach niedermolekularen Verbindungen mit immunstimulierenden Eigenschaften zu fahnden, wofür es zu Beginn der Arbeiten begründete Anhaltspunkte gab.

Für die chemischen und immunologischen Untersuchungen wurden zwei ausländische Drogen ausgewählt, Uncaria tomentosa und Okoubaka aubrevillei, die in der Erfahrungsmedizin als Wundheilungsmittel und zur Infektionsprophylaxe eingesetzt werden und einen immunstimulierenden Wirkmechanismus vermuten lassen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die hierfür verantwortlichen Wirkprinzipien zu isolieren und aufzuklären.

Außerdem war zu untersuchen, in welchen Stoffklassen des niedermolekularen Bereichs bevorzugt solche potentiellen Immunstimulantien auftreten. Neben einigen bekannten Immuntesten sollte für diese Screening-Untersuchungen die neu entwickelte Chemilumineszenz-Methode eingesetzt werden.

KAPITEL 1:

Niedermolekulare Pflanzeninhaltsstoffe und aus der Volksmedizin bekannte Drogen mit immunstimulierenden Eigenschaften

## 1. Immunstimulantien (Immunmodulatoren)

Neben der gezielten Unterdrückung von Abwehrvorgängen durch sogenannte Immunsuppressiva bei Organtransplantationen und Autoimmunkrankheiten wie Lupus erythematodes, primär chronische Polyarthritis, multiple Sklerose und Myasthenia gravis (1-3) interessiert heute die primär unspezifische Steigerung humoraler und zellulärer Abwehrmechanismen durch sogenannte Immunstimulantien.

Da Immunstimulantien auch T-Suppressorzellen stimulieren und damit unter Umständen einen gegenteiligen Effekt auslösen können, hat man den Begriff der Immunmodulation oder Immunregulation eingeführt. Man versteht hierunter jegliche Einflußnahme und Veränderung der Immunantwort.

Die Anwendungsgebiete für Immunstimulantien oder Immunmodulatoren sind vielfältig: an erster Stelle steht die Vorbeugung und Bekämpfung von bakteriellen und viralen Infekten.

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Immuntherapie neoplastischer Erkrankungen durch eine direkte Aktivierung von Makrophagen oder T-Killerzellen, die den Tumor in seinem Wachstum hemmen, oder indirekt durch Stimulierung des durch die Cytostatika- oder Strahlentherapie noch nicht geschädigten zellulären Immunsystems. Eine weitere, allerdings noch wenig erforschte Einsatzmöglichkeit bietet die Therapie bestimmter Autoimmunkrankheiten. Dabei müßten gezielt Thymus-Suppressorzellen stimuliert werden. Die erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen im Alter und die Zunahme von Autoaggressionskrankheiten infolge steigender Antikörpertiter gegen körpereigenes Gewebe käme als weiteres Anwendungsgebiet für eine Immuntherapie in Frage (4-12). Unter Immunstimulantien versteht man heute Stoffe

oder Stoffgemische, die spezifische und unspezifische körpereigene Abwehrmechanismen induzieren oder die Immunantwort auf ein gleichzeitig mitverabreichtes Antigen verstärken. Dabei haben Immunstimulantien selbst nur eine geringe oder keine antigene Wirkung (13).

Für die beiden Stimulationstypen wurden die Begriffe Mitogene und Adjuvantien eingeführt.
Mitogene stimulieren unspezifisch die Proliferation antigensensitiver Zellen, ohne daß diese gegen die betreffende Substanz selbst sensibilisiert werden. Ihre Wirkung tritt schnell ein, ist kurz und führt zu keiner Gedächtnisreaktion. Die Art der dadurch erreichten Immunität wird auch als "Paramunität" bezeichnet (14).
Als Immunadjuvantien werden Stoffe definiert, die eine Verstärkung der spezifischen Immunantwort bei gleichzeitiger Gabe mit einem Antigen hervorrufen (15).
Unter einem dritten von BREKHMAN (16) eingeführten Begriff der adaptogenen Wirkung wird die "Steigerung der nicht spezifischen Resistenz gegen verschiedene nicht antigen induzierte schädliche Umwelteinflüsse physikalischer, chemischer und biologischer Natur" verstanden. Eine direkte Stimulation des Immunsystems scheint nicht im Vordergrund zu stehen. Möglicherweise wird diese Art der Resistenzsteigerung über endokrine Mechanismen induziert.

## 2. Niedermolekulare Naturstoffe mit Einfluß auf bestimmte Immunparameter

Ausgehend von der rein empirisch angewendeten Reizkörpertherapie, bei der durch Injektion von Milcheiweiß, Eigenblut, abgetöteten Bakterienaufschwemmungen sowie durch Applikation von Tierorganextrakten, pflanzlichen Extrakten und spezifischen Entzündungsstoffen, wie z.B. Senföl und Terpentinöl, versucht wurde, eine Umstimmung von Stoffwechselvorgängen herbeizuführen, befaßte man sich in den letzten Jahren bevorzugt mit bestimmten Polymerverbindungen aus Pflanzen. Man erkannte, daß bestimmte Polysaccharide, Peptide und Proteine in mannigfacher Weise zelluläre und humorale Abwehrsysteme unspezifisch zu stimulieren vermochten. Im Grunde genommen haben für diese Untersuchungen die polymeren antigenen Lipopolysaccharide von gramnegativen Bakterien Modell gestanden. Die bisherigen Ergebnisse sind in Übersichtsarbeiten von BELKIN (17), WHISTLER (18) und WAGNER (19,20) niedergelegt. Einige Verbindungen, wie z.B. Polysaccharide von Algen und Pilzen, sind bereits arzneilich zur Adjuvanstherapie von Tumorerkrankungen eingesetzt worden. Ein Nachteil dieser Verbindungsklasse ist, daß die meisten ihrer Vertreter Gemische darstellen und chemisch nicht definiert sind. Die Reproduzierbarkeit von immunologischen Untersuchungen ist daher nicht gewährleistet. Somit dürften die meisten der bisher beschriebenen Verbindungen die Forderung der WHO nach chemisch reinen und chemisch definierten Verbindungen, sowie die wirkverlustfreie Lagerungsfähigkeit für mindestens 12 - 18 Monate (21) nicht erfüllen.

Diese Ansprüche sind durch niedermolekulare Verbindungen eher zu erfüllen. Es wurden bereits eine große Zahl von niedermolekularen potentiellen synthetischen Immunstimulantien entwickelt, wobei die Wirksamkeit des ursprünglich als Anthelmintikum entwickelten Levamisols in zahlreichen in-vitro- und in-vivo-Versuchen gesichert werden konnte. Den Hauptanteil dieser Stoffe stellen stickstoffhaltige Verbindungen dar.

Eine Übersicht über den Stand dieser Arbeiten gibt KRALOVEC (22). Auch über niedermolekulare pflanzliche Verbindungen mit immunstimulierender Wirkung gibt es einige Literaturhinweise.

## 2.1. Aristolochiasäure

Als Prototyp niedermolekularer Verbindungen mit erwiesener immunstimulierender Wirkung kann die Aristolochiasäure (AS) gelten. Aristolochia clematitis (Aristolochiaceae) wurde schon von den alten Ägyptern und Griechen bei allen Arten der Wundinfektion eingesetzt. Diese Indikation hat bis in die heutige Zeit ihre Gültigkeit behalten (23).

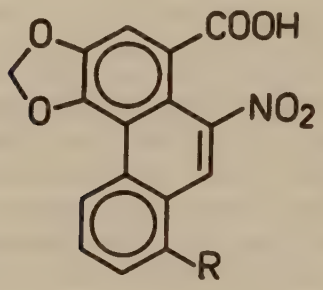
1961 entwickelte MÖSE (24) Versuchsmodelle, mit denen er eine Stimulierung der körpereigenen Abwehrmöglichkeiten des Organismus nachweisen konnte. Als Testextrakt wurde ein nach den Vorschriften des Homöopathischen Arzneibuchs hergestellter Auszug aus Aristolochia clematitis gewählt. Bei der Untersuchung der Phagozytoseaktivität von Kaninchenleukozyten stellte er eine Steigerung der Phagozytoseaktivität auf das Doppelte des Ausgangswertes fest, nachdem die Tiere über mehrere Tage verschiedene Verdünnungen des Aristolochiaauszuges i.v. injiziert bekommen hatten. Die Verdünnung D3 war dabei am wirksamsten. Ab der Verdünnung D7 war keine Wirkung mehr zu erkennen.

Da die Fähigkeit der Leukozyten zur Phagozytose gerade bei der üblichen Wundheilung von großer Bedeutung ist, war mit diesem Versuch auch die volksmedizinische Anwendung der Droge wissenschaftlich untermauert.

1963 konnte dann ebenfalls MÖSE zeigen, daß die Aristolochiasäure das für die Phagozytosesteigerung verantwortliche Wirkprinzip der Pflanze darstellt (25). Die AS führte wie der Aristolochiaextrakt zur Phagozytoseaktivierung, diesmal aber bereits in höherer Verdünnung.

Alle weiteren, bisher durchgeführten Teste mit der Aristolochiasäure sind in Tabelle 1 und 2 (S. 7 u. 8) aufgeführt.

Die damals im Versuch eingesetzte AS hat sich später als ein Gemisch der beiden Säuren AS I und AS II herausgestellt:




AS I : R = $OCH_3$

AS II: R = H

Die Säuren verhalten sich in verschiedenen chromatographischen Trennverfahren einheitlich und können nur mit größerem Arbeitsaufwand voneinander getrennt werden (26).

In Aristolochia clematitis kommen AS I und AS II in etwa gleichen Mengenverhältnissen vor (27). In dem häufig zur Testung verwendeten Präparat Tardolyt $^{R}$ der Fa.Madaus wurden 55% AS I und 45% AS II gefunden (28). SCHUNACK(28) und MÖSE (25) stellten in ihren Versuchen keinen signifikanten Wirkunterschied zwischen den beiden Säuren fest. Bei pharmakologischen Untersuchungen wird deshalb auch weiterhin mit dem Säuregemisch als "Aristolochiasäure" gearbeitet.

Tabelle 1: Immunologische in-vivo-Teste mit Aristolochiasäure

| Testsystem | Applikation | Ergebnis |
|---|---|---|
| 1) Infektionsteste mit durch leukozytäre Abwehr bekämpfbaren Erregern | | |
| a) systemische Infekte mit Pneumokokken, Staphylokokken,etc. | i.p. 5 - 50 µg/kg vor und während der Infektion | erhöhte Überlebenszeiten der behandelten Mäuse, teilweise Ausheilungen (25,28,29,30) |
| b) Infektion einer Wunde mit verschiedenen Erregern | i.p., perorale, lokale Applikation von 0.5 µg/kg Ratte vor und/oder nach Infektionssetzung | Steigerung der Phagozytose-aktivität der Leukozyten, bei lokaler Anwendung ist der Effekt am schwächsten (25) |
| 2) Beeinflussung der Phagozytoseaktivität des RES im Carbon- bzw. Coli-Clearancetest | Mäuse erhalten 48, 24 und 3 Stdn. vor der Tusche- bzw. Coli-Applikation 0.3 - 0.5 µg/kg i.p. | in beiden Versuchsanordnungen signifikante Steigerung des Phagozytoseindexes (31) |
| 3) verzögerte Überempfind-lichkeitsreaktion im Hauttest | 1 Tag vor Beginn der Immunisierung bis zum Ende des Tests täglich i.p. 6 µg/kg Versuchstier Kaninchen | stärkere Hautreaktion als Kontrolle (32) |

Tabelle 2: Immunologische in-vitro-Teste mit Aristolochiasäure

| Testsystem | Applikation | Ergebnis |
|---|---|---|
| 1) Steigerung der Phagozytoserate von Leukozyten im Tierversuch | Meerschweinchen bzw. Mäuse erhalten über mehrere Tage i.p. 0.3-10 µg/kg | signifikante Steigerung der Phagozytoserate von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (25,30) |
| 2) Steigerung der Phagozytoserate von Leukozyten gesunder Versuchspersonen | a) Leukozyten nicht vorbehandelter Menschen werden in vitro mit 1 µg/ml AS versetzt<br>b) Versuchspersonen erhalten über 10 Tage oral 15 µg/kg AS | in beiden Versuchsanordnungen signifikanter Anstieg der Leukozyten-Phagozytoseaktivität (33,34) |
| 3) Aufhebung der Phagozytenschädigung durch verschiedene Medikamente im Tierversuch | Meerschweinchen erhalten Chloramphenicol, Cyclophosphamid, Prednison, anschließend Gabe von 0.25 µg/kg i.p. | Phagozytoseaktivität der geschädigten Leukozyten wird auf Normalwert angehoben (35,36) |
| 4) Verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion im Lymphozyten-Makrophagen-Testsystem | Kaninchen erhalten 1 Tag vor Beginn der Immunisierung bis zum Ende des Tests täglich 6 µg/kg i.p. | die peripheren Lymphozyten der behandelten Tiere bilden signifikant mehr MIF als unbehandelte Kontrolltiere (32) |

Unwirksam war AS bei Infektionen, die durch die leukozytäre Abwehr kaum beeinflußbar sind (z.B. Virus- oder Toxoplasmen-Infektionen). Außerdem fand sich in verschiedenen Veröffentlichungen kein Hinweis auf eine adjuvatorische Wirkung (25,35,37). Im Immunozytenadhärenzversuch wurde keine Vermehrung von Lymphozyten unter AS-Einfluß festgestellt (38).

## 2.2. Weitere niedermolekulare Verbindungen mit stimulierender Wirkung auf das Immunsystem

Wie die nachfolgende tabellarische Übersicht (Tab. 3, S.10) erkennen läßt, finden wir Verbindungen mit stimulierender Wirkung auf das zelluläre Immunsystem in den verschiedensten Stoffklassen.

Die Skala der beeinflußten Immunparameter reicht von der Phagozytosesteigerung und T-Lymphozytentransformation bis zur Interferoninduktion und Steigerung der Antikörperproduktion. Einige Substanzen wurden nur im in-vitro-Versuch, andere in vivo und wenige in beiden Systemen geprüft. Nahezu in allen Fällen fehlen Dosis-Wirkungs-Studien und klinische Versuche. Doppelblindstudien wurden in keinem Falle durchgeführt. Aus den erwähnten Gründen sind die einzelnen Untersuchungsergebnisse nicht miteinander vergleichbar.

Auffallend ist das gehäufte Auftreten von potentiellen Wirkstoffen in der Stoffklasse der N-haltigen Verbindungen, der Phenole, Chinone und der Terpene.

Tabelle 3: Naturstoffe mit stimulierender Wirkung auf die zelluläre Immunabwehr

| | Verbindung | Vorkommen | Wirkung |
|---|---|---|---|
| I. ALKALOIDE | Cepharanthin (Bisbenzylisochinolinalkaloid) | Stephania cepharanta Stephania sasaki | Steigerung der lokalen Wirt-gegen-Transplantat-Abstoßungsreaktion (39), verhindert die durch Cytostatika verursachte Abnahme von Leukozyten im Blut (40) |
| | Berbamin (Bisbenzylisochinolinalkaloid) | verschiedene Berberis-Arten, Atherosperma moschatum | Anstieg der Leukozytenzahl im Blut (41) |
| | Matrin (Lupinalkaloid) | Sophora-Arten | Anstieg der Leukozytenzahlen im Blut (41) |
| | Pilocarpin (Imidazolalkaloid) | Pilocarpusarten | Stimulation der Zellproliferation in Milzzellkulturen (42) |
| II. PHENOLE/ CHINONE | 2,3-Dihydroxybenzoesäure | ubiquitär, vor allem in Zellsuspensionen von Bakterien | Steigerung der Phagozytose (43) |
| | Ferulasäure | ubiquitär | Steigerung der Phagozytose (44) |
| | Forphenicin +) (Aminosäurederivat) | in Kulturen von Actinomyces fulvoviridis | erhöht die Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (45) |

+) Forphenicin steht stellvertretend für verschiedene ähnlich gebaute Aminosäurederivate von Bakterienkulturen, die die zelluläre Immunität steigern.
Eine Übersicht über diese Substanzen gibt UMEZAWA (46).

Fortsetzung Tabelle 3 - Seite 11

Fortsetzung Tabelle 3:

| Verbindung | Vorkommen | Wirkung |
|---|---|---|
| Anethol | in den Ölen zahlreicher Apiaceenfrüchte | Steigerung der Zahl der Leukozyten im Blut (47) |
| Cleistanthin (Lignan) | Cleistanthus collinus | Erhöhung der Zahl der neutrophilen Granulozyten (48) |
| Curculigosid (Phenolglucosid) | Curculigo orchioides | Steigerung der Phagozytose (49) |
| Urushiole (Brenzkatechinderivate mit $C_{15}/C_{17}$-Seitenketten) | Rhus toxicodendron | induziert Blastogenese von peripheren Blutlymphozyten (50) |
| α-Tocopherol (Vitamin E) | ubiquitär in verschiedenen Pflanzenölen | Steigerung der Phagozytoserate (43), Erhöhung der T-Helfer-Zellaktivität (51), Aktivierung der Lymphozytenproliferation (52), Erhöhung der Überlebensrate von Versuchstieren im Infektionsbelastungsmodell (53) |
| Ubichinone (hauptsächlich Q7, Q8) | ubiquitär | Aktivierung der Makrophagenphagozytose, Steigerung der Clearance-Rate von Kohle, Erhöhung der Zahl der peripheren Granulozyten bei mit Cyclophosphamid vorbehandelten Tieren, höhere Überlebensrate von granulocytopenischen Mäusen bei experimentell erzeugten Bakterieninfektionen (54,55) |

Fortsetzung Tabelle 3 - Seite 12

Fortsetzung Tabelle 3:

| | Verbindung | Vorkommen | Wirkung |
|---|---|---|---|
| | Maesanin (Chinon mit $C_{15}$-Seitenkette) | Maesa lanceolata | Erhöhung der Überlebensrate von Versuchstieren bei experimentell erzeugten Infektionen (56) |
| III. TERPENE | Zexbrevin A/B (Sesquiterpen-lactone vom Germacrantyp) | Zexmenia brevifolia | Anstieg der Zahl der T- und B-Lymphozyten im Blut (57) |
| | 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat, TPA (tetracyclisches Diterpen) | Croton tiglium | Aktivierung der Umwandlung von Makrophagen in tumorcytostatische Effektorzellen (58), Erhöhung der $^3$H-Thymidineinbaurate in T- und B-Lymphozyten (59), Steigerung der Makrophagenphagozytoseaktivität und gleichzeitig erhöhte Freisetzung von Plasminogenfaktor und $H_2O_2$ aus Makrophagen (60,61,62), Steigerung der gemischten Lymphozytenreaktion (63) |
| | Saponine mit Aglykon Oleanolsäure (pentacyclisches Triterpen) | Aralia mandschurica | Erhöhung der Phagozytoseaktivität, Erhöhung der Phagozytenzahl von mit Cyclophosphamid vorbehandelten Versuchstieren, Erhöhung der Überlebensdauer von mit subletalen Dosen röntgenbestrahlten Versuchstieren (64) |
| | Cynanchosid (Steroidglykosid) | Cynanchum caudatum | Erhöhung der Makrophagenphagozytoseaktivität, Erhöhung der Zahl der T- und B-Lymphozyten (65) |

## 3. Auswahl von Drogen und Verbindungsklassen für immunologische Untersuchungen

Es gibt mehrere Möglichkeiten der Arzneistoffindung bei Pflanzen. Sie gelten auch für die vorliegenden Untersuchungen.

1. Man folgt der volksmedizinischen Erfahrung oder Erfahrungsmedizin und wählt solche Drogen aus, die bisher rein empirisch zur Prophylaxe und Bekämpfung viraler und bakterieller Infektionen und zur Tumorbekämpfung verwendet wurden.

2. Man greift Literaturangaben auf, in denen durch verschiedene Untersuchungen die die Körperabwehr steigernden Eigenschaften einer Droge nachgewiesen wurden, ohne daß das Wirkprinzip bekannt ist oder näher charakterisiert werden konnte.

3. Man untersucht isolierte Pflanzenreinsubstanzen, die mit den aus der Literatur bekannten Wirkstoffen strukturelle Verwandtschaft zeigen (vgl. dazu Tab. 3, S.10-12).

Nachfolgend sind die wichtigsten in der Literatur genannten bzw. in Phytopräparaten enthaltenen Drogen aufgelistet, für die auf Grund erfahrungsmedizinischer Beobachtungen und Therapiebeschreibungen eine stimulierende Wirkung auf das Immunsystem erwartet werden konnte oder denkbar wäre.
Als Quellen dienten unter anderem die Rote Liste 1983 (66), ein homöopathisches Lehrbuch (67) und "Drogenkunde" von H.A. HOPPE, 1975 (68), sowie Berichte in ärztlichen Zeitschriften.
Nicht aufgeführt in der Übersicht sind jene Drogen, für die anderweitig schon eine direkte antivirale Wirkung nachgewiesen wurde. Hier sei auf die Screening-Untersuchungen verschiedener Arbeitskreise hingewiesen (69-75).

Das gleiche gilt für die klassischen "Antitumordrogen", über die ebenfalls eine Reihe von Übersichtsarbeiten erschienen sind (76-79).

Was die direkt antiviral oder direkt cytotoxisch wirksamen Drogen anlangt, so wurden Wirkungen nur bei der bisher üblichen "Hochdosierung" beobachtet. Denkbar wäre, daß bei extrem niedrigen Dosierungen auch immunologische Wirkungen nachweisbar werden. Für diese Hypothese gibt es in der Tat eine Reihe von Belegen.

Auf dieses Phänomen der Wirkänderung oder Wirkumkehr in Abhängigkeit von der Dosierung wird später noch eingegangen werden.

Außerdem gibt es einige randomisierte Screening-Untersuchungen an willkürlich ausgewählten, d.h. nicht aus der Erfahrungsmedizin stammenden Pflanzen, wie die von DI CARLO (80) und DELAVEAU (81), die als "unspezifisch abwehrsteigernd" bezeichnet wurden.

Die dort verwendeten Teste weisen durchweg Mängel auf. So sind in fast allen Fällen Kombinationen mehrerer festgelegter Versuchsparameter vorgenommen worden: nur eine Testmethode, in der die Testextrakte lediglich in einer Dosierung, Applikation und Zubereitungsform untersucht wurden.
Es fehlen Angaben über die statistische Aussagefähigkeit der Untersuchungsergebnisse. Die erzielten Resultate sind daher wenig aussagekräftig und untereinander nicht vergleichbar.

Tabelle 4: Arzneipflanzen, deren allopathische oder homöopathische Anwendung auf eine Stimulation des zellulären Immunsystems schließen läßt

| Drogenname (Familie) | verwendeter Pflanzenteil | Anwendungsgebiete | niedermolekulare Hauptinhaltsstoffe (nach HAGER(23)) |
|---|---|---|---|
| Aconitum napellus (Ranunculaceae) | Knolle | fieberhafte Erkrankungen, akute Entzündungen | terpenoide Esteralkaloide, Hauptalkaloid Aconitin, Aconitsäure und andere Säuren |
| Atropa belladonna (Solanaceae) | Blatt | nur in Homöopathie bei entzündlichen Erkrankungen | Tropaalkaloide, Hauptalkaloid L-Hyoscyamin, Scopoletin (Cumaringlykosid), Flavonoide |
| Baccharis-Arten (Asteraceae) | blühendes Kraut | bei fieberhaften Erkrankungen, Wundheilmittel, Herpes zoster | äth.Öl, Flavonoide, Di- und Triterpene, nicht näher aufgeklärte Alkaloide |
| Baptisia tinctoria (Fabaceae) | ganze Pflanze | septische Erkrankungen mit Fieber, äußerlich gegen Geschwüre | Chinolizidinalkaloide: Cytisin, Methylcytisin, 13-Hydroxyspartein, Anagyrin, Scopoletin, Flavonoide |
| Bryonia dioica (Cucurbitaceae) | Wurzel | nur in Homöopathie bei septischen Erkrankungen | Cucurbitacinglykoside, verschiedene Aminosäuren, Catechingerbstoffe |
| Cynanchum vincetoxicum (Vincetoxicum officinale) (Asclepidiaceae) | Blatt | bei Fieber, Wundheilung | Isochinolinalkaloide, Hauptalkaloid Tylophorin, Flavonoide |

Fortsetzung Tabelle 4 - Seite 16

Fortsetzung Tabelle 4:

| Drogenname (Familie) | verwendeter Pflanzenteil | Anwendungsgebiete | niedermolekulare Hauptinhaltsstoffe nach HAGER(23) |
|---|---|---|---|
| Drosera rotundifolia (Droseraceae) | Kraut | Keuchhusten, Bronchitis | Plumbagin und andere Naphtocinonderivate, Säuren, Flavonoide |
| Echinacea angustifolia, Echinacea purpurea (Asteraceae) | blühendes Kraut, Wurzel | bei fiebrigen Erkrankungen, eitrigen Prozessen, schlecht heilenden Wunden, zur Stimulation des Lymphdrüsensystems, zur Steigerung der Abwehrfunktion gegen bakterielle Erkrankungen | beide Arten haben ähnliches Inhaltsstoffmuster: isomere Kohlenwasserstoffe $C_{15}H_{28}$, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, Sterine, Betain, Echinacosid (flavonoidartige Ververbing) |
| Eupatorium perfoliatum, Eupatorium cannabinum (Asteraceae) | blühendes Kraut | bei fieberhaften Infekten, Grippe, Erkältung, als Wundheilmittel | beide Arten haben ähnliches Inhaltsstoffmuster: Sesquiterpenlactone vom Germacranolidtyp, Euparin (Benzofuranderivat), Echinatin, Supinin (Pyrrolizidinalkaloide), Flavonoide, verschiedene Pflanzensäure, Acetylenverbindungen |
| Euphorbia resinifera (Euphorbiaceae) | Milchsaft | zu Pflastern und Salben bei Hautleiden, Katarrhe | α,β-Euphorbol, Taraxerol (Triterpene), verschiedene Säuren |
| Euphrasia officinalis (Scrophulariaceae) | blühendes Kraut | Entzündungen aller Art, Haut- und Schleimhauterkrankungen | Aucubin (Furanderivat-Glucosid), Flavonoide, Gallusgerbstoffe |

Fortsetzung Tabelle 4 - Seite 17

Fortsetzung Tabelle 4:

| Drogenname (Familie) | verwendeter Pflanzenteil | Anwendungsgebiete | niedermolekulare Hauptinhaltsstoffe nach HAGER(23) |
|---|---|---|---|
| Gelsemium sempervirens (Loganiaceae) | Wurzel | Grippe und grippale Infekte | Indolalkaloide Gelsemin, Sempervirin, Cumarine, Gerbstoffe |
| Hypericum perforatum (Hypericaceae) | Kraut | Wundheilmittel, besonders bei Geschwüren | Hypericin und andere Anthrachinonderivate, ätherisches Öl, Saponine, Flavonoide, Gerbstoffe |
| Marrubium vulgare (Lamiaceae) | Kraut | bei Wunden, Geschwüren und anderen Hautleiden | verschiedene Diterpene (Marrubiin, Marrubenol), Flavonoide, Anthocyane, Tannine |
| Myristica sebifera (Myristicaceae) | frischer Saft der Baumrinde | bei Furunkeln und eitrigen Abszessen | Inhaltsstoffe bisher ungeklärt |
| Okoubaka aubrevielli (Octoknemataceae) | Holz und Rinde des Stammes | Vorbeugung und Behandlung verschiedener Infektionskrankheiten | Inhaltsstoffe bisher ungeklärt |
| Phytolacca americana (Phytolaccaceae) | Wurzel, Blätter | grippale Infekte, verschiedene Hauterkrankungen | Phytolaccin (Alkaloid), Saponine, Pflanzensäuren, fettes Öl, Gerbstoffe |
| Rhus toxicodendron (Anacardiaceae) | Blatt | bei Infekten, Fieber, Hautleiden | Urushiol (Gemisch von Brenzkatechinderivaten), Flavonoide, Gerbstoffe |

Fortsetzung Tabelle 4 - Seite 18

Fortsetzung Tabelle 4:

| Drogenname (Familie) | verwendeter Pflanzenteil | Anwendungsgebiete | niedermolekulare Hauptinhaltsstoffe nach HAGER(23) |
|---|---|---|---|
| Rumex crispus (Polygonaceae) | Wurzel | Bronchitis, Rhinitis, Heiserkeit, grippale Infekte | Chrysophansäure, Emodin und andere Anthrachinonderivate, Tannin, Anthocyane, Flavonoide |
| Schoenocaulum offic. (Sabadilla officinalis) (Liliaceae) | Samen | grippale Infekte | Sterinalkaloide, Hauptalkaloid, Cevadin, verschiedene Säuren |
| Scrophularia nodosa (Scrophulariaceae) | Kraut, Wurzel | Ekzeme und andere Hautleiden | Saponine, Gerbstoffe, Flavonoide |
| Thuja occidentalis (Cupressaceae) | Zweige | resttoxische Zustände nach verschiedenen Infekten, bei Hautgeschwüren | ätherisches Öl, Flavonoide, verschiedene Säuren |
| Uncaria tomentosa (Rubiaceae) | Wurzelrinde | zur Wundheilung | Indolalkaloide, Hauptalkaloide Rhynchophyllin, Isorhynchophyllin |
| Viscum album (Loranthaceae) | frische Pflanze ohne verholzte Teile | Adjuvanstherapie bei verschiedenen Krebsarten | β-Sitosterin, β-Amyrin, verschiedene Flavonoide, Aminosäuren und Amine, Phenolcarbonsäuren (z.B. p-Hydroxybenzoesäure, Ferula- und Protocatechusäure) |

KAPITEL 2:

## Pharmakologische Screening-Methoden

Zur Prüfung von Drogenextrakten und Einzelsubstanzen auf immunstimulierende und cytotoxische Eigenschaften wurden in unserem Arbeitskreis nachfolgende in-vitro- und in-vivo-Testmodelle erstellt.

### 1. Granulozytentest modifiziert nach BRANDT

Neutrophile Granulozyten sind zusammen mit Makrophagen die wichtigsten Effektorzellen der Phagozytose und nehmen damit eine wichtige Stellung in der Infektabwehr ein. Sie stellen etwa 60 - 70% aller weißen Blutkörperchen im menschlichen Blut dar. Die Phagozytoseleistung dieser Granulozyten läßt sich in vitro nach einer von BRANDT (82) entwickelten und von TYMPNER (83) modifizierten Methodik messen.

Dabei wird aus dem Blut gesunder Probanden eine Granulozytenfraktion gewonnen (auch PMNL von engl. polymorphnuclear leucocytes genannt).

Diese PMNL-Fraktion besteht hauptsächlich aus neutrophilen Granulozyten neben wenig eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten. Nach Zusatz einer definierten Menge von Hefezellen (Saccharomyces cerevisiae) und der zu testenden Substanz wird zunächst 10 min bei 37°C inkubiert, die Aufschwemmung auf einem Objektträger ausgestrichen und weitere 35 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Ausstriche angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Pro Objektträger werden 100 PMNL-Zellen ausgezählt und bestimmt, wieviele Hefepartikel von den einzelnen Zellen phagozytiert wurden. Der Phagozytoseindex gibt die durchschnittliche Anzahl von phagozytierten Hefepartikeln an (Berechnung siehe Exp.Teil IV. 1.1., S. 137).

## 2. Chemilumineszenztest

Obwohl der Granulozytentest nach BRANDT eine zuverlässige Methode zur Ermittlung phagozytosesteigernder Eigenschaften von Substanzen und Extrakten darstellt, ist er sehr zeit- und personalaufwendig. Eine Alternative bietet die neue Methode der Chemilumineszenzmessung phagozytierender Zellen.

### 2.1. Chemilumineszenz (CL) von phagozytierenden Zellen

Seitdem ALLEN (84) als erster die Lichtemission von neutrophilen Granulozyten während der Phagozytose von Latexpartikeln und verschiedenen Bakterien entdeckte und NELSON (85) und WEIDEMANN (86) CL-Erscheinungen an phagozytierenden Blutmakrophagen (Monozyten) nachweisen konnten, wird diese Reaktion auch in der experimentellen und klinischen Immunologie angewendet. Der genaue Mechanismus der dabei ablaufenden Reaktion konnte allerdings bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Zusammenfassend läßt sich die bei aktivierten Phagozyten auftretende CL folgendermaßen darstellen: der Kontakt dieser Zellen mit Bakterien, Viren oder anderem körperfremden Material, z.B. auch chemische Substanzen, führt zunächst zu einer gesteigerten Sauerstoffaufnahme. Anschließend werden in der Zelle aus dem molekularen Sauerstoff Superoxid-Anion-Radikale $^{\bullet}O_2^-$ gebildet, die sich dann entweder spontan oder enzymatisch katalysiert in andere aktivierte Sauerstoffmoleküle, wie Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$), Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$), Hydroxylradikale ($^{\bullet}OH$) und Hypochlorit-Anionen ($OCl^-$) umwandeln (87,88). Dieser Vorgang wird "respiratory burst" genannt (89).

Durch die Freisetzung der aktivierten Sauerstoffmoleküle in die unmittelbare Umgebung der phagozytierenden Zelle, wie auch in die phagozytische Vakuole selbst und durch die Aktivierung lysosomaler Enzyme können eingedrungene Mikroorganismen oder Tumorzellen geschädigt oder getötet werden. Auch andere Moleküle sind daran beteiligt, so z.B.

sogenannte kationische Proteine und Laktoferrin. Die Zellwände der Mikroorganismen werden durch Oxidation oder Reduktion angegriffen und teilweise zerstört. Als Nebeneffekt tritt dabei CL auf, da das Zellwandmaterial als chemilumineszierendes Substrat für die aktivierten Sauerstoffmoleküle dient.

Die geringe Lichtausbeute solcher CL-Reaktionen phagozytierender Zellen wird im in-vitro-Experiment durch den Zusatz von Substanzen erhöht, die durch aktivierten Sauerstoff oxidiert werden und dabei Licht bestimmter Wellenlänge erzeugt, welches physikalisch gemessen werden kann. Als Substrate eignen sich dabei Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) und Lucigenin (10,10'-Dimethyl-9,9'-biacridiniumdinitrat), welche die CL-Antwort um das $10^3$fache steigern (90).

## 2.2. Meßmethode

Durch den Einsatz empfindlicher Meßgeräte, in denen die Photonenzählung mit Hilfe von Photomultipliern erfolgt, läßt sich die durch die oben genannten Substanzen verstärkte CL messen.
In der vorliegenden Arbeit wurde ein 6-Kanal-CL-Gerät benutzt, das sechs Testungen zur gleichen Zeit ermöglicht. Darüberhinaus erlaubte es das verwendete Gerät auch, die CL-Antwort zeitabhängig zu registrieren. So konnten wir den Dosis-Wirkungs-Kurven als dritte Dimension die zeitabhängige Wirkung hinzufügen.

Zur in-vitro-Untersuchung der phagozytosesteigernden Wirkung von Substanzen können entweder gereinigte Zellpopulationen von Granulozyten oder Makrophagen verwendet werden (91), oder die Messung erfolgt direkt in verdünntem Vollblut (92). Die Aktivierung der Phagozyten erfolgt dabei durch feste Partikel, z.B. opsonierte Bakterien, Zymosan und Latexpartikel, oder durch bestimmte gelöste Substanzen. Bekannte Aktivatoren sind z.B. verschiedene Ionophoren und Fluorid-Ionen (93).

3. Carbon-Clearance-Test (CCT) nach BIOZZI

Mit diesem von BIOZZI (94,95) entwickelten in-vivo-Test wird die Phagozytoseaktivität von Gewebsmakrophagen des Reticoloendothelialen Systems (RES) bestimmt. Dabei werden Versuchstieren gelatinestabilisierte Kohlepartikel intravenös injiziert, in bestimmten Zeitabständen Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen und die Elimination der Kohle durch photometrische Trübungsmessung bestimmt. An der Elimination körperfremder Partikel sind die Kupffer'schen Sternzellen der Leber zu 90% und die Makrophagen der Milz zu 10% beteiligt.

Die exponentielle verlaufende Kohleelimination kann durch eine Gerade (log E gegen t) dargestellt werden, deren negative Steigung als Regressionskoeffizient K bezeichnet wird. Wird eine potentiell stimulierende Substanz eine bestimmte Zeit vor Versuchsbeginn, z.B. 24 oder 48 Stdn., ein- oder mehrere Male in einer bestimmten Konzentration gegeben, so kann durch Vergleich des Regressionskoeffizienten mit dem des Blindwertes auf eine Phagozytosesteigerung geschlossen werden. Ist das Verhältnis $K_{Subst.}/K_{Kontrolle} < 1$, so besitzt die Testsubstanz eine suppressive Wirkung auf die Phagozytoseaktivität. Ist das Verhältnis $> 1$, so liegt eine Stimulierung vor.

4. Lymphozytentransformationstest

Im Lymphozytentransformationstest wird die Induktion der Blasten-Transformation normaler Lymphozyten und deren anschließende Mitose gemessen. Dazu wird die zu untersuchende Substanz mit isolierten Lymphozyten oder mit verdünntem Vollblut inkubiert, die Proben mit $^{14}C$- bzw. $^{3}H$-Thymidin markiert und erneut inkubiert. Das in die Zell-DNA eingebaute markierte Thymidin wird am Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer gemessen (96,97).
Die Versuche wurden in der Bayerischen Landesimpfanstalt München bei Prof.Dr.H.Stickl durchgeführt.

5. Prüfung auf Cytotoxizität durch den $^{3}$H-Thymidin-Einbautest an Asciteszellen

Um eine mögliche Beziehung zwischen Phagozytosesteigerung und Cytotoxizität bei potentiellen Wirkstoffen auffinden zu können, prüften wir die zellschädigende Wirkung am Modell des $^{3}$H-Thymidineinbautests in Asciteszellen.

In diesem in-vitro-Testsystem nach WEITZEL u. Mitarb. (98) kann die Cytotoxizität von Substanzen durch Hemmung der DNA-Synthese von Tumorzellen zahlenmäßig durch die veränderten Einbauraten von $^{3}$H-Thymidin in Asciteszellen von Walker-250-Carcinosarkomen von Ratten erfaßt werden.

KAPITEL 3:

Eigene Erfahrungen bei der Durchführung und Auswertung der Teste

1. Vorbereitung der Proben für immunologische Untersuchungen

Voraussetzung bei allen Testungen ist eine klare Löslichkeit des Testmaterials. Bei der Untersuchung von lipophilen Extrakten und Substanzen dienen die als Lösungsvermittler zugesetzten Verbindungen, wie Carboxymethylcellulose oder Dimethylsulfoxid, in den jeweils getesteten Konzentrationen als Bezugswert, da die Lösungsvermittler teilweise selbst stimulieren. Im CCT ist von dem Einsatz von DMSO wegen der hohen Toxizität abzuraten.

Eine nicht einwandfrei gelöste Substanz liefert im Granulozyten- und CL-Test keine reproduzierbaren Ergebnisse. Im CCT steigern kleine Dosen intraperitoneal applizierter Substanzsuspensionen die Aktivität des RES (99).

Außerdem sollte die Testlösung möglichst keimarm zubereitet werden. So enthalten nämlich grampositive Bakterien in ihrer Zellwand Polysaccharide, die teilweise stimulierend auf die Phagozytoseleistung von Granulozyten wirken könnten. Auch die Lipopolysaccharide aus den Zellwänden gramnegativer Bakterien, sogenannte Endotoxine, beeinflussen möglicherweise das Testergebnis. Eine Übersicht über immunstimulierende Eigenschaften von bakteriellen Lipopolysacchariden gibt FRIEDMAN (100).
Nach HALPERN (101) zeigen lebende Bakterien und Bakterienextrakte eine starke RES-stimulierende Wirkung. Daneben besitzen einige Endotoxine Nebenwirkungen, wie Pyrogenität, Antigenität und toxische Stoffwechselveränderungen (102), die sich ebenfalls störend im CCT bemerkbar machen können.

Es empfiehlt sich daher, die Testlösungen steril zu filtrieren und im Tiefkühlschrank aufzubewahren.

## 2. Reproduzierbarkeit, Genauigkeit und Aussagekraft des Granulozytentestes

Zur Abschätzung der Genauigkeit bzw. Reproduzierbarkeit wählten wir den relativen Variationskoeffizienten $V_r$, das ist die relative prozentuale Standardabweichung des Mittelwertes. Durch Berechnung von $V_r$ lassen sich die Standardabweichungen verschiedener Messungen miteinander vergleichen (103). Während die Mittelwerte bei getesteten Rohextrakten und angereicherten Substanzgemischen Schwankungen bis zu 15% zeigten, liegen die Abweichungen der Mittelwerte bei Reinsubstanzen um 7% (Berechnung siehe Exp.Teil IV. 1.2., S. 138). Damit stellt der Granulozytentest besonders für Reinsubstanzen eine gut reproduzierbare und genau arbeitende Methode dar.

Da der Test einen Teil des immunologischen Gesamtgeschehens simuliert, kann davon ausgegangen werden, daß die getesteten Substanzen auch in vivo wirksam sind, vorausgesetzt, daß sie unverändert an den Wirkort gelangen. Für Aristolochiasäure als niedermolekulare Verbindung konnte dies bereits bewiesen werden (siehe Kapitel 1, 2.1., S. 5). Über den dabei ablaufenden Mechanismus ist allerdings noch wenig bekannt.

## 3. Chemilumineszenztest

### 3.1. Durchführung des Tests

Bei den ersten orientierenden Messungen stellte sich heraus, daß die verschiedenen Angaben der Literatur zur Durchführung der CL-Messungen schlecht reproduzierbar waren.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Substanzen auf die phagozytoseinduzierte Bildung von aktiviertem Sauerstoff hängt die CL-Antwort,abgesehen von dem verschiedenen Aktivierungspotential der eingesetzten Verbindungen, in besonderem Maße von der Funktionsfähigkeit der Phagozyten, dem Meßzeitpunkt und der Temperatur, dem pH-Wert, der Zusammen-

setzung des Mediums sowie der verwendeten CL-Verstärkersubstanz ab (85,104).

Die von ALLEN (90,105) und WULFF (106) ausgearbeiteten Vorschriften mußten in verschiedenen Punkten modifiziert bzw. abgeändert werden.

Alle Testungen erfolgten im 6-Kanal-Biolumat LB 9505 der Fa.Berthold, angeschlossen an einen Apple-Computer mit einem CL-Auswertungsprogramm der Fa.Berthold.

Zur Lichtverstärkung wählten wir Lucigenin, welches Photonen bei einer schmalen Wellenlängenverteilung um 510 nm emittiert und sich damit nahezu im Optimum der Empfindlichkeit des Photomultipliers des von uns verwendeten Gerätes befindet.

Der pH-Wert der Meßlösung sollte zwischen 7.1 und 7.4 liegen, was durch den Zusatz veronalgepufferter Kochsalzlösung erreicht wird. Die Testsubstanzen wurden in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Puffer) gelöst. Beide Puffersysteme enthalten 0.1% Glucose, da die "respiratory-burst"-Reaktion mit einem Anstieg des Glucose-Metabolismus verbunden ist (89).

Zur Phagozytenaktivierung verwendeten wir opsoniertes Zymosan. Die Messung der CL isolierter Granulozyten erfolgte mit aus Nativblut isolierten polymorphkernigen Leukozyten (PMNL), die mit PBS-Puffer auf $10^6$ Zellen/µl eingestellt wurden.
Da die CL-Messungen mit Vollblut einen durch die Erythrozyten hervorgerufenen Farbquench ergaben, verdünnten wir 1:100 mit PBS-Puffer. Dadurch konnte der Farbquench weitgehend reduziert werden.

Die Testsubstanzen wurden zusammen mit den isolierten Granulozyten oder dem Vollblut zunächst 10 min bei Raumtemperatur und anschließend im Biolumat bei 37°C 10 min inkubiert. Nach Zusatz des opsonierten Zymosans begann die Messung im Biolumat bei 37°C. Die CL-Antwort jeder Probe

wurde über 60 min beobachtet und die Meßwerte in cpm graphisch dargestellt. Dabei ergibt sich ein für jede Substanz typischer Kurvenverlauf. Die integrierten Flächen sind der Intensität der CL-Antwort direkt proportional.

Zur Berechnung der erfolgten Stimulation des "respiratory burst" von Granulozyten verwendeten wir die gleiche Formel wie beim Granulozytentest.

## 3.2. Anwendung der CL-Methode und Vergleich mit dem Granulozytentest

Nach der Literatur konnte davon ausgegangen werden, daß alle im Granulozytentest nach BRANDT positiv reagierenden Extrakte bzw. Substanzen auch im CL-Versuch ein positives Resultat ergeben. Unbekannt war, wie weit beide Meßergebnisse miteinander korrelierten und wie genau die CL-Methode im Vergleich zum Granulozytentest ist. Außerdem mußte die CL-Messung mit isolierten Granulozyten mit der der Vollblutmethode verglichen werden.

### 3.2.1. Drogenextrakte

Drogenextrakte eignen sich nach den bisherigen Untersuchungen nicht oder nur beschränkt für CL-Messungen. Ein im Granulozytentest wirksamer Preßsaft aus Echinacea purpurea (Wirkungsmaximum bei $10^{-3}$% mit einer Phagozytosesteigerungsrate von 31.5%) zeigte bei der CL-Testung in unverdünnter Form keinerlei CL-Antwort. Bis zu einer Konzentration von $10^{-3}$% stieg die gemessene Photonenemission langsam an und erreichte bei $10^{-4}$% den Kontrollwert, der auch bei weiteren Verdünnungen nicht überschritten wurde. Eine ähnliche Beobachtung machten wir bei dem ethanolischen Auszug aus Eupatorium perfoliatum (Wirkungsmaximum im Granulozytentest bei $10^{-3}$% mit einer Steigerungsrate von 24.1%). Hier wurde erst bei einer Verdünnung von $10^{-6}$% die CL-Antwort der Kontrolle erreicht (107). Bei einem Gesamtextrakt aus Uncaria tomentosa erhielten

wir zwar eine über der Kontrolle liegende CL-Antwort, doch war diese nicht reproduzierbar.

Diese Ergebnisse führen wir darauf zurück, daß in den Gesamtextrakten Verbindungen vorliegen, die mit dem als CL-Verstärker zugesetzten Lucigenin um die freigesetzten aktivierten Sauerstoffmoleküle konkurrieren. Solche Substanzen sind z.B. ungesättigte Fettsäuren, Tocopherole, Polyalkohole, Gallussäureester und Aminosäuren (108).

### 3.2.2. Reinsubstanzen

Für die CL-Untersuchungen an Reinsubstanzen haben wir das Na-Salz der Aristiolochiasäure ausgewählt, da für diese Verbindung die phagozytosesteigernde Wirkung gesichert ist (siehe Kapitel 1, 2.1., S. 5) und bereits Konzentrations-Wirkungs-Daten aus dem Granulozytentest vorlagen.

#### 3.2.2.1. Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit der Granulozyten- und Vollblut-Methode

Erwartungsgemäß erwies sich die Messung an isolierten Granulozyten mit einem relativen Variationskoeffizienten von 7 - 8% als die genauere Methode, während wir mit Vollblut eine Schwankung der Mittelwerte von rund 16% erhielten (siehe Exp.Teil IV. 2.3., S. 141).

Bei der PMNL-Methode konnten wir noch in Verdünnungen von $10^{-9}$% eine signifikante Steigerung der CL-Antwort registrieren.
Dagegen war die Vollblutmethode weit weniger empfindlich. Nur bei einer Konzentration von $10^{-3}$% war eine Steigerung meßbar. Schwächere Konzentrationen gaben nur sehr geringe Zählausbeuten (Tabelle 5, S. 29).

Das dürfte vor allem auf dem trotz Verdünnung des Vollblutes noch vorhandenen Quencheffekt der Erythrozyten zurückzuführen sein. Die cpm der Kontrolle liegen in diesem Test wesentlich unter denen des PMNL-Tests.

Durch diese Ergebnisse sind die Einsatzbereiche der beiden CL-Methoden festgelegt. Die schnell durchführbare Vollblutmethode eignet sich lediglich zur Vorauswahl von immunstimulierend wirkenden Substanzen. Die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven dagegen ist nur durch die CL-Messung mit isolierten Granulozyten möglich.

Tabelle 5: Prozentuale Steigerung der CL-Antwort bei der Vollblut- und PMNL-Methode, Testsubstanz Aristolochiasäure

| | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ | $10^{-7}$ | $10^{-8}$ | $10^{-9}$ | $10^{-10}$ (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vollblut | - | 51.9 | 19.2 | 21.8 | 14.0 | 5.5 | - | - | - |
| PMNL | - | - | 85.1 | 93.5 | 68.3 | 61.9 | 58.7 | 31.3 | - |

Da bei beiden Methoden häufig starke Abweichungen einzelner Meßwerte vom Mittelwert auftraten und in einigen Fällen die prozentualen Steigerungsraten zwischen zwei Meßreihen erheblich differierten, müssen die Teste mindestens 3mal durchgeführt werden. Bei der Berechnung des Mittelwertes bleiben die stark abweichenden Werte dann unberücksichtigt.

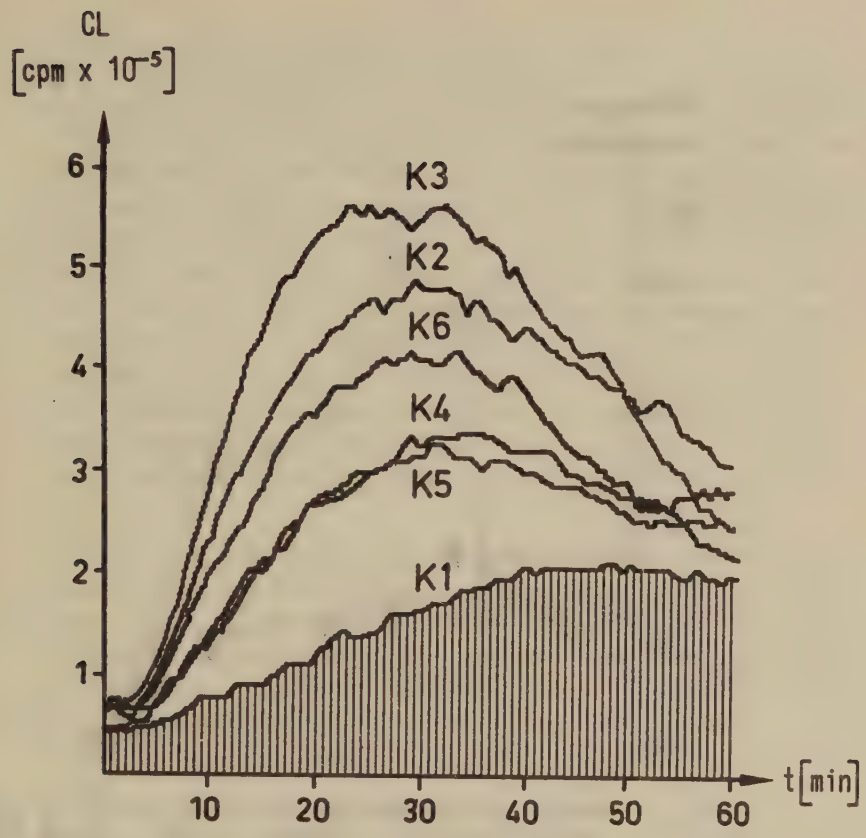
3.2.2.2. Vergleich der CL-Methode mit dem Granulozytentest

Wie im Granulozytentest war auch im CL-Test mit isolierten Granulozyten eine dosisabhängige Steigerung der Phagozytoseaktivität in Form der "respiratory burst"-Reaktion feststellbar. Als Beispiel für die CL-Antwort verschiedener Aristolochiasäure-Konzentrationen ist in Abbildung 1, S. 31, die Computeraufzeichnung eines Meßdurchganges wiedergegeben. Dabei korrelierten die Ergebnisse dieser Messungen mit denen des Granulozytentests recht gut. Lediglich das Wirkungsmaximum lag im CL-Test mit einer Konzentration von $10^{-5}$% um eine

Zehnerpotenz niedriger als beim Granulozytentest. Die im Granulozyten- und CL-Test nach der gleichen Formel errechneten Prozentzahlen können allerdings nicht direkt miteinander verglichen werden, da die Meßprinzipien beider Verfahren unterschiedlich sind.

Ein Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von Aristolochiasäure im Granulozyten- und CL-Test ist in Abb. 2, S. 32, wiedergegeben.
Die gute Übereinstimmung der Kurvenverläufe bei beiden Testmethoden ist offenbar darauf zurückzuführen, daß das im CL-Test ablesbare Maximum der Stimulation bei den einzelnen Konzentrationen zwischen 29 und 35 min lag und damit auch innerhalb der Testdauer des Granulozytentest.
Umgekehrt ermöglicht die CL-Methode durch Verlängerung der Testdauer, z.B. auf 2 Stdn., Wirkungen auch bei solchen Substanzen zu erfassen, die durch eine langsamer verlaufende Stimulation von Granulozyten gekennzeichnet sind.
Eine Verlängerung der Testdauer im Granulozytentest ist nicht möglich, da hier die Granulozyten nach 60 min morphologische Veränderungen zeigen und teilweise auch schon absterben. Dies ist auf ein zu langes Verweilen in körperfremdem Milieu (Sedimentation in "feuchter Kammer") zurückzuführen (109).

Nach unseren Untersuchungen stellt die CL-Methode mit isolierten Granulozyten sowohl von der Genauigkeit als auch von der Empfindlichkeit her einen vollwertigen Ersatz für den arbeitsaufwendigeren Granulozytentest nach BRANDT dar, wobei durch die Erfassung der zeitabhängigen Stimulation eine noch detailliertere Beschreibung der Phagozytosevorgänge ermöglicht wird.




| Kanal | Konzentration (%) | Peak-Maximum (cpm x $10^{-5}$) | $t_{max}$ (min) | Steigerung der CL-Antwort (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Kontrolle | 2.12 | 50.0 | - |
| 2 | $10^{-4}$ | 4.80 | 30.0 | 126.4 |
| 3 | $10^{-5}$ | 5.52 | 32.6 | 160.3 |
| 4 | $10^{-6}$ | 3.40 | 34.6 | 69.8 |
| 5 | $10^{-7}$ | 3.24 | 32.0 | 52.8 |
| 6 | $10^{-8}$ | 4.10 | 29.3 | 93.4 |

Abb. 1
Steigerung der CL-Antwort verschiedener Aristolochiasäurekonzentrationen

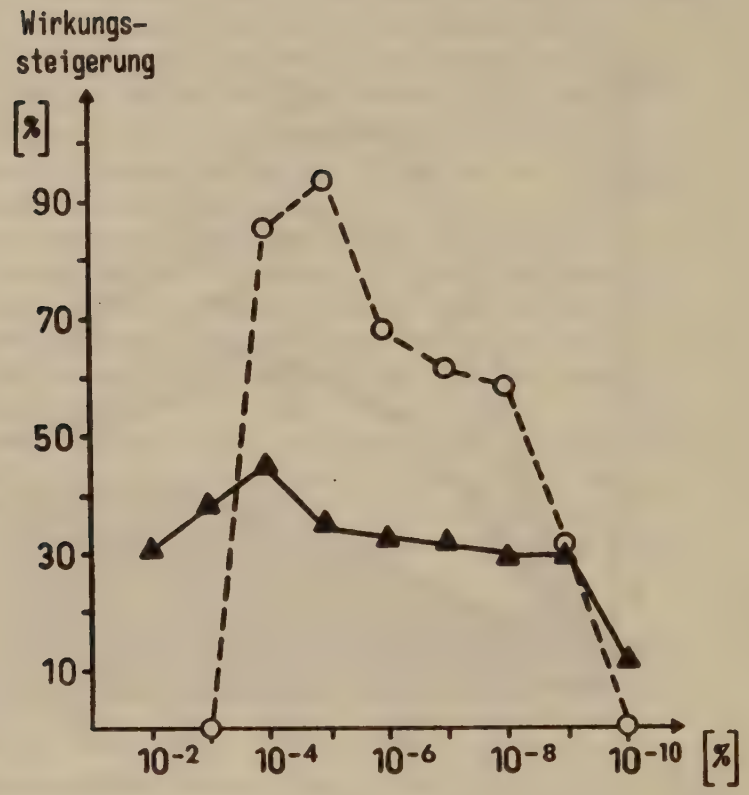



Abb. 2

Vergleich der Dosis-Wirkungskurven von Aristolochiasäure im Granulozyten- und CL-Test

4. Carbon-Clearance-Screening-Untersuchungen

Der Regressionskoeffizient K der Kohleelimination differiert von Individuum zu Individuum in Abhängigkeit von Leber- und Milzgewicht, so daß erst nach Einbeziehung dieser Größen die wahre Eliminationskonstante ermittelt werden kann. Dieser Wert wird in der Literatur als α-Wert bezeichnet (94). Unsere Untersuchungen mit verschiedenen Substanzen haben jedoch gezeigt, daß die Quotienten der α-Werte kaum von den Quotienten der K-Werte abweichen. Dies ist offenbar darauf zurückzuführen, daß alle in diesem Test verwendeten Mäuse einem Stamm angehören und die Streuung der Körpermaße in engen Grenzen liegt. Damit kann auf die in der Literatur geforderte Bestimmung der Leber- und Milzgewichte verzichtet werden.

Außerdem ergaben vergleichende Untersuchungen, daß die Verwendung von aus statistischen Gründen geforderte Kollektivgröße von 7 Mäusen ebenfalls nicht notwendig ist. Bereits ein Kollektiv von 3 Mäusen pro Substanzkonzentration ermöglicht in Screening-Untersuchungen eine Aussage über die RES-stimulierende Wirkung der Testverbindung. Bei positivem Befund soll der Test mit 5 Mäusen wiederholt werden.

Die in diesen Tierexperimenten gefundenen Ergebnisse lassen sich nach der Literatur auch auf den Menschen übertragen (110,111).

5. Cytotoxizität und Phagozytosesteigerung

Im Granulozytentest lysierten einige Substanzen in hoher Konzentration die Granulozyten.
Die Testung auf eine zellschädigende Wirkung solcher Substanzen wurde am Modell des $^{3}$H-Thymidineinbautests durchgeführt, wobei Extrakte und Alkaloidgemische aus Uncaria tomentosa (siehe Kapitel 4, D. 4., S. 75) und Emetindihydrochlorid untersucht wurden. Durch die Gegenüberstellung der gefundenen Werte mit den Ergebnissen des Granulozytentests, die in

Abbildung 3, S. 35, am Beispiel des Emetins dargestellt ist, wird die auch bei anderen niedermolekularen Verbindungen gemachte Beobachtung bestätigt, wonach in hoher Konzentration cytotoxisch wirkende Substanzen bei weiterer Verdünnung auf $10^{-2}$% oder $10^{-3}$% stimulierend auf die Phagozytoseleistung isolierter Granulozyten wirken. Inwieweit sich allerdings diese Aussage verallgemeinern läßt, und ob sie auch auf höhermolekulare Verbindungen übertragbar ist, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

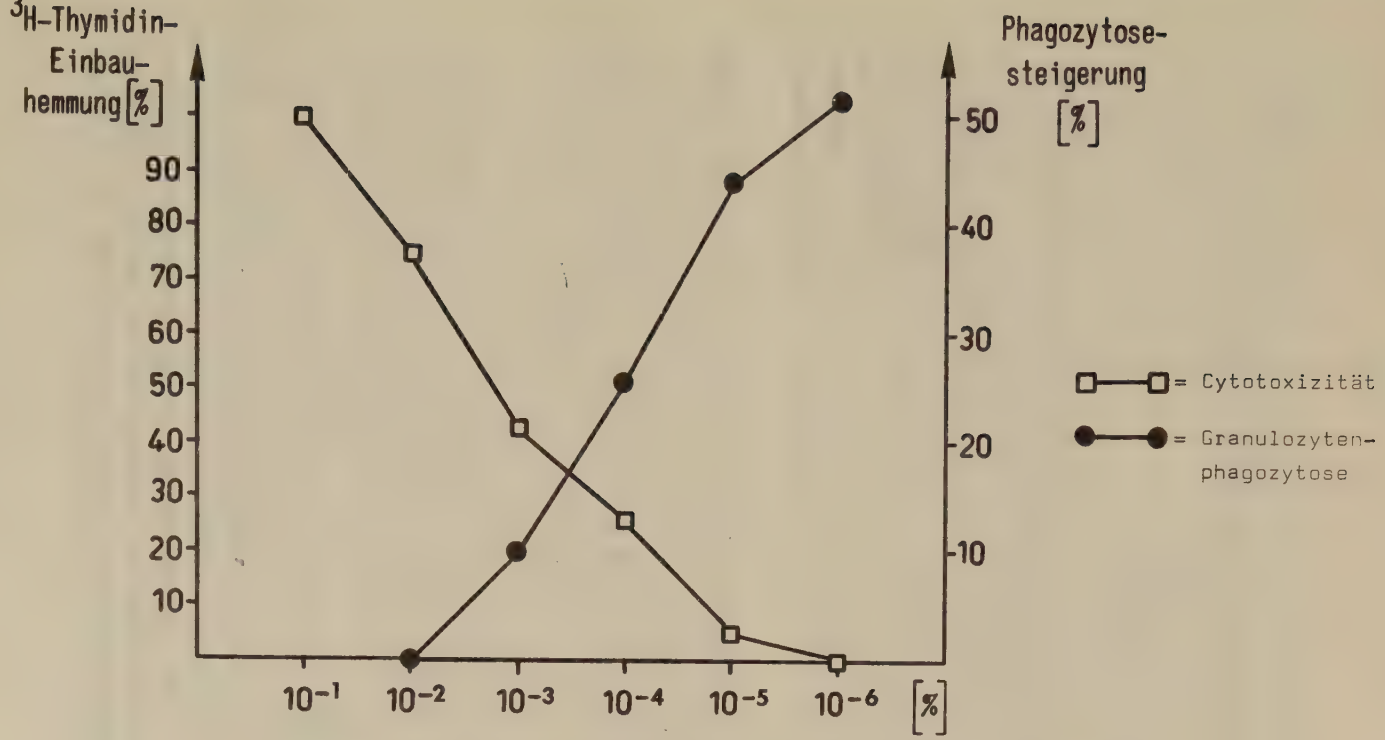



Abb. 3

Zusammenhang zwischen Cytotoxizität und Granulozytenphagozytose am Beispiel des Emetins

## KAPITEL 4:

## Phytochemische und immunologische Untersuchungen von Uncaria tomentosa WILLD.

### A. Allgemeine Übersicht

#### 1. Medizinische Verwendung und bisherige pharmakologische Untersuchungen von Uncaria-Drogen

Eine volksmedizinische Anwendung der aus den nördlichen Teilen Südamerikas stammenden Pflanze Uncaria tomentosa ist nicht bekannt. Dagegen werden die getrockneten Blätter der ebenfalls im nördlichen Südamerika beheimateten Art Uncaria guainensis äußerlich zur Heilung von Wunden und als Aufguß zur Behandlung von Dysenterien verwendet (112).

Auch bei anderen Uncaria-Arten in den geographisch weit voneinander entfernten Gebieten Afrikas und Süd-Ost-Asiens fällt die häufige Verwendung dieser Drogen gegen schlecht heilende Wunden und Ekzeme auf. Dieses Indikationsgebiet macht eine Einflußnahme auf die Phagozytoseaktivität von Granulozyten bzw. Makrophagen wahrscheinlich (vgl. Ausführungen über Aristolochiasäure).

Interessanterweise wird von den Indianern Perus und benachbarter Gebiete ein "Una de gato" genanntes Mittel, das möglicherweise synonym für Uncaria tomentosa steht (113), innerlich als Antitumortherapeutikum eingesetzt (114).
In Österreich wird der wässrige Extrakt der braunen Uncaria tomentosa-Varietät krebskranken Menschen verabreicht, wobei aber die normale Cytostatika- und/oder Bestrahlungstherapie fortgesetzt wird. Einige der bei der Behandlung durch die Cytostatika auftretenden Nebenwirkungen konnten durch die Gabe von Uncaria tomentosa deutlich gemildert werden: der Immunglobulintiter des Blutes wurde wieder

angehoben, die Zahl der Leukozyten stieg während der Behandlung um etwa 45% an (115).

Als Gesamtdroge wurde Uncaria tomentosa pharmakologisch nicht bearbeitet.
Es liegen lediglich Untersuchungsergebnisse einiger in dieser Pflanze enthaltener Reinalkaloide vor.

So wirkt Rhynchophyllin hypotensiv (116,117), uterusstimulierend (118) und antipyretisch (119), Isorhynchophyllin und Hirsutin erwiesen sich in Modellversuchen als mit Hexamethonium vergleichbare Ganglienblocker (120) und erhöhten die parasympathische Reizübertragung (121). Zusätzlich hemmte Hirsutin die Kontraktion der quergestreiften Muskulatur (122).
Mitraphyllin wirkte in einer Untersuchung von GORMAN (123) diuretisch.

Immunologische Untersuchungen wurden mit den Reinsubstanzen bisher nicht durchgeführt.

## 2. Vorkommen und botanische Beschreibung von Uncaria tomentosa

Uncaria tomentosa gehört zur Familie der Rubiaceae und Ordnung Gentianales. Die Pflanze kommt hauptsächlich in Zentralamerika und dem nördlichen Südamerika (Surinam, Trinidad, Kolumbien und Peru) vor und ist neben Uncaria guainensis der einzige Vertreter dieser Gattung in Amerika.

Uncaria tomentosa stellt ein holziges Lianengewächs dar, die jungen Äste von etwa 0.5 cm Ø sind etwas eckig und fein längsgestreift. Die Blattstellung ist dekussiert, die Knoten im Abstand von 2 bis 5 cm sind nicht verdickt. Die ovalen auf einem ca. 0.5 cm langen Blattstiel sitzenden, an der Unterseite stark behaarten Blätter sind 5 bis 10 cm lang und 3 bis 6 cm breit, ganzrandig und laufen in einer assymetrischen stumpfen Spitze aus. Die 4 bis 6 Seitennerven jeder Seite, die einen Winkel von 40° bilden, treten auf der Blattunterseite deutlich hervor. Die kleinen ovalen, paarigen Nebenblätter zwischen den Blattstielen findet man nur an den Spitzenknospen und den Knoten des oberen Teils der jungen Zweige, da sie früh abfallen und zwei gerade Narben an jedem Knoten hinterlassen. Die einzeln stehenden Blüten sind zu kugeligen Blütenständen zusammengefaßt und wachsen am Ende von Nebenästen. Die Blüten haben einen fünfzipfeligen leicht behaarten Kelch mit einer Länge von etwa 3.5 bis 5 mm und einer Breite von etwa 1 mm. Die zusammengewachsenen Kelchblätter bilden

am Grund eine nicht behaarte Röhre mit unterständigem coenocarpen Fruchtknoten und vielen Samenanlagen. Die kleinen Früchtchen mit dickem Exo- und Endocarp sind kurzgestielt und enthalten zahlreiche kleine Samen. Nach Abfallen der Früchte wird aus den Resten des blattachselständigen Blütenzweiges ein 0.5 bis 1 cm langer gekrümmter holziger Dorn gebildet, der dem Klettern dient ("Klimmhaken")((124, 125), Abb. 4, S. 39).

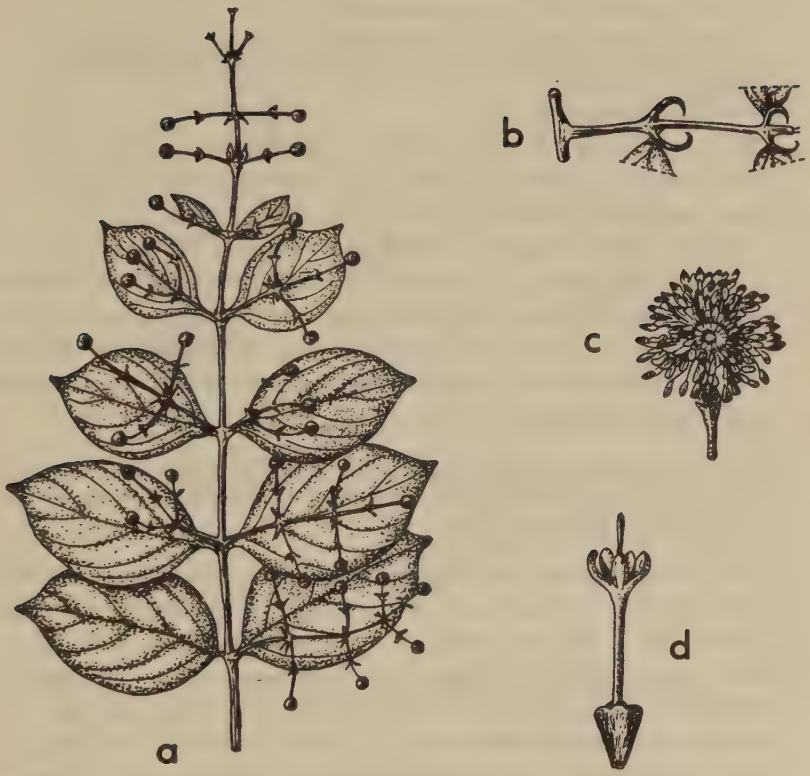
Nach KEPLINGER (115) kommt Uncaria tomentosa in Peru in drei Unterarten vor, die sich in der Färbung des frischen Bastes voneinander unterscheiden. So wurden Pflanzen mit weißer, gelbbrauner und dunkelroter Bastfärbung gefunden.

## 3. Bisher bekannte Inhaltsstoffe aus Uncaria tomentosa

Während die asiatischen und afrikanischen Uncaria-Arten phytochemisch gut untersucht sind (126), waren die beiden südamerikanischen Arten bisher Gegenstand nur weniger Arbeiten. 1952 isolierte RAYMOND-HAMET Rhynchophyllin als Hauptalkaloid aus Uncaria guainensis (127).

Erst 1974 wurden von PHILLIPSON und Mitarb.(128) Uncaria tomentosa und Uncaria guainensis im Rahmen eines Screening-Programmes über das Alkaloidmuster verschiedener Uncaria-Arten bearbeitet.
Die Inhaltsstoffklärung erfolgte lediglich auf dünnschichtchromatographischem Wege. Untersucht wurden die Blätter und Stengel mehrerer Pflanzenproben beider Arten. Hauptalkaloide waren Isorhynchophyllin und Rhynchophyllin zusammen mit ihren N-Oxiden. Als Nebenalkaloide wurden Mitraphyllin und Hirsutein sowie Isomitraphyllin, Dihydrocorynanthein und Hirsutin mit den entsprechenden N-Oxiden gefunden. In einem Exemplar ließen sich zusätzlich noch Isorotundifolin und Rotundifolin als Nebenalkaloide nachweisen.
Uncaria guainensis zeigte eine fast identische Alkaloidführung, lediglich Isomitraphyllin konnte nicht detektiert werden.

Weitere phytochemische Untersuchungen über Uncaria tomentosa lagen zum Zeitpunkt unserer Arbeiten nicht vor.




a = blühender Zweig
b = Zweig mit "Klimmhaken"
c = Blütenstand am Ende eines Seitenzweiges
d = einzelne Blüte

Abb. 4

Habituszeichnung von Uncaria tomentosa nach C.E.RIDSDALE (124)

## B. Isolierung und Identifizierung der Wurzelalkaloide von Uncaria tomentosa (braune Varietät)

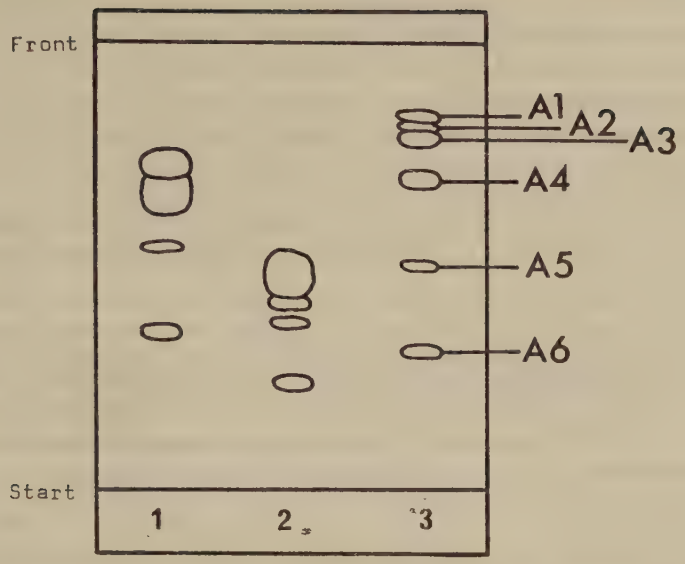
### 1. Lokalisierung des immunologischen Wirkprinzips von Uncaria tomentosa

In einer ersten orientierenden Testung zur Lokalisation des immunologischen Wirkprinzips wählten wir zunächst den Granulozytentest modifiziert nach BRANDT (82). Hiermit konnten wir die Alkaloidfraktion des Drogenextraktes zumindest als eines der immunologischen Wirkprinzipien der Pflanze identifizieren (siehe D. 1.1., S. 65). Für eine eingehendere immunologische Untersuchung sollte daher zunächst die genaue Zusammensetzung des Rohalkaloids untersucht werden.

### 2. Gewinnung des Rohalkaloidgemisches, dünnschichtchromatographische Untersuchung

Die Gewinnung des Rohalkaloids führten wir nach einer modifizierten Methode nach PHILLIPSON (126) durch. Das Wurzelpulver wurde mit 10%igem $NH_3$ durchfeuchtet, 1 Stde. bei Zimmertemperatur stehen gelassen und unter IR-Licht schonend getrocknet. Anschließend mazerierten wir die Droge mit Ethylacetat über vier Tage am Magnetrührer. Der so gewonnene Rohextrakt wurde eingeengt und solange mit 2%iger $H_2SO_4$ ausgeschüttelt, bis die wässrige Phase keine positive Valser-Reaktion (129) mehr zeigte. Die wässrige Phase versetzten wir dann bis zur alkalischen Reaktion bei pH 8 - 9 mit festem $Na_2CO_3$. Durch mehrmaliges Ausschütteln der wässrigen Phase mit Ethylacetat erhielten wir aus 750 g Droge 6.75 g eines hellbraun gefärbten Rohalkaloidgemisches, entsprechend einer Ausbeute von 0.9%.

Die DC-Untersuchung in verschiedenen Laufmitteln und die Farbreaktionen mit spezifischen Sprühreagentien (130) ergaben folgendes Ergebnis (Abb. 5, S. 41).




1 = LM I
2 = LM II
3 = LM III

Detektion: UV 254 nm, essigsaurer Dragendorff

Abb. 5

DC-Untersuchung des Rohalkaloidgemisches

Die mit essigsaurem Dragendorff (131) detektierbaren Substanzen zeigten im UV 254 nm eine Fluoreszenzminderung, im UV 366 nm aber keine Eigenfluoreszenz. Mit Ehrlichs Reagens (132) erhielten wir keine Farbreaktion, beim Nachbesprühen der bereits mit Dragendorff behandelten Platte mit $FeCl_3$/Perchlorsäure zeigten sich nach Erhitzen einheitlich rosa gefärbte Zonen.

Dadurch konnten wir das Vorliegen der tetracyclischen Heteroyohimbine Dihydocorynanthein, Hirsutin und Hirsutein sowie der tetracyclischen Oxindole Rotundifolin und Isorotundifolin ausschließen, die mit Ehrlichs Reagens rote Färbungen ergeben und mit Eisen-III-chlorid/Perchlorsäure nach Erhitzen durch eine Braunfärbung erkennbar sind (130).

Wir benannten die sechs im basischen Laufmittel auftrennbaren Alkaloide mit absteigendem $R_f$-Wert zunächst mit A1 - A6.

Die Substanzen A4, A5 und A6 konnten den Vergleichssubstanzen Isorhynchophyllin, Mitraphyllin und Rhynchophyllin zugeordnet werden. Die genaue Identifizierung dieser Substanzen erfolgte nach ihrer Isolierung (siehe 4., S. 43).

Die Aufarbeitung eines anschließend hergestellten Methanolextraktes konnte entfallen, da dieser praktisch alkaloidfrei war.

Der Nachweis von N-Oxiden in dem Methanolextrakt nach einem von HUIZING (133) ausgearbeiteten Verfahren verlief negativ.

## 3. Isolierung der Alkaloide

### 3.1. Säulenchromatographie des Rohalkaloids

Obwohl wir mit dem basischen Laufmittel die beste DC-Auftrennung der Alkaloide erhielten, ist dieses für die Isolierung nicht geeignet, da die Oxindol-Alkaloide in alkalischem Milieu leicht isomerisieren.
Die Auftrennung von 1.5 g Rohalkaloid erfolgte daher über Kieselgelsäulen in LM VI.
Dadurch erhielten wir das Alkaloid A6 in reiner Form und A5 in einer stark angereicherten Fraktion. Die Alkaloide A1 - A4 ließen sich erwartungsgemäß nicht auftrennen.
Durch eine Chloroform-Ethylacetat-Gradientenelution wurde auch A5 in reiner Form erhalten:

A5: 5.0 mg, Smp. 264 - 268°C $[\alpha]_D^{24} = -4.3°$

A6: 17.5 mg, Smp. 214 - 216°C $[\alpha]_D^{24} = -15.1°$

## 3.2. Präparative Schichtchromatographie von A1 - A4

Die Reindarstellung der Alkaloide A1, A2, A3 und A4 versuchten wir durch präparative Schichtchromatographie auf handelsüblichen Kieselgelplatten von 0.25 mm Schichtdicke. Für eine saubere Auftrennung bei einer Auftragemenge von 2 mg pro Platte erwies sich eine dreimalige stufenförmige Entwicklung in Abständen von jeweils 5 cm am geeignetsten. Dabei wurde zunächst in LM IV und anschließend zweimal in LM V entwickelt. Die Detektion der Alkaloide erfolgte im UV 254 nm.

Wir eluierten die Zonen mit Ethylacetat-Methanol (1:1) von dem Trägermaterial und erhielten nach Membranfiltration A1 und A4 in reiner Form.

A2 und A3 konnten erst nach präparativer Schichtchromatographie auf HPTLC-Platten unter den oben genannten Laufbedingungen bei Auftragemengen von 0.5 mg pro Platte getrennt werden.

Aus 100 mg Alkaloidgemisch erhielten wir

A1: 14.5 mg, Smp. 204 - 209°C $[\alpha]_D^{24} = -85.1^\circ$

A2: 2.4 mg, Smp. 214 - 219°C -

A3: 9.7 mg, Smp. 96 - 105°C (Z) $[\alpha]_D^{24} = +14.5^\circ$

A4: 34.1 mg, Smp. 138 - 141°C $[\alpha]_D^{24} = +7.8^\circ$

# 4. Identifizierung der isolierten Alkaloide

## 4.1. Massen- und UV-Spektren

Die Massenspektren von Uncaria-Alkaloiden erlauben neben der Ermittlung des Molekulargewichtes eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Strukturtyp innerhalb der Indolalkaloid-Reihe und eine Aussage über die Art der Ringsubstitution. Eine Ableitung der Stereochemie der Verbindung durch Vergleich der relativen Häufigkeit der einzelnen

Peaks mit Literaturwerten ist dagegen nach BECKETT (134) nicht möglich, da teilweise erhebliche Abweichungen in der relativen Häufigkeit der Fragmentionen in Abhängigkeit von der Arbeitstemperatur und der Aufenthaltsdauer der Verbindung im Spektrometer auftreten.

Die Massenspektren der sechs isolierten Alkaloide zeigten die in Tabelle 6, S. 45, aufgeführten typischen Fragmentierungsmuster.

In allen Spektren fehlt der für Heteroyohimbine charakteristische $M^+$-1 Peak. Damit war das Vorliegen der tetracyclischen Heteroyohimbine Dihydrocorynanthein, Hirsutin und Hirsutein, wie sie von HEMINGWAY in Uncaria tomentosa beschrieben wurden (128), ausgeschlossen.

Bei den vorliegenden Alkaloiden handelt es sich ausschließlich um Oxindole: die Ionen m/e 144 und 130 sind charakteristisch für alle Indolalkaloide. Die Signale m/e 146 und 145, entstanden durch die Fragmentierung der Oxindoleinheit, sind den Ionen 1 und 2 der Abbildung 6, S. 46, zuzuordnen (135).

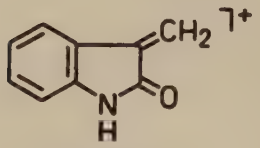
Die pentacyclischen Oxindole zeichnen sich durch einen intensiven Peak bei m/e 223 (3 der Abb. 6, S. 46) aus. Er entsteht durch Spaltung der C5-C6- und der C3-C7-Bindung. Der Hauptteil des Ions 3 geht unter Verlust des Pyran-Ringes in die Verbindung 4 (m/e 69) über. Ein kleiner Teil von 3 produziert nach Abspaltung der $CH_3$-Gruppe am ehemaligen C19 einen schwachen Peak bei m/e 208. Daneben entsteht aus 3 ein ebenfalls schwächerer Peak bei m/e 180 (5).

Die tetracyclischen Oxindole verhalten sich wie pentacyclische Oxindole und geben neben dem Massenpeak einen auffälligen Peak bei m/e 239 (6). Dieses Ion geht ebenfalls unter Verlust des Pyran-Ringes in die Verbindung 4 mit m/e 69 über. Daneben können aus 6 noch die Methyl-, Ethyl- oder Methoxygruppe abgespalten werden, was die Peaks bei m/e 224, 210 und 208 zur Folge hat.

Tabelle 6: Typische Fragmentionen der isolierten Alkaloide

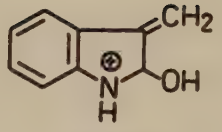
| Substanz | $M^+$ | Fragmentionen (relative Häufigkeit %) |
|---|---|---|
| A 1 | 368(100) | 223(70), 208(35), 180(14), 146(11), 145(9), 144(5), 130(25), 69(45) |
| A 2 | 368(100) | 223(84), 208(25), 180(20), 146(8), 145(11), 144(11), 130(14), 69(35) |
| A 3 | 368(70) | 223(100), 208(10), 180(4), 146(6), 145(5), 144(7), 130(11), 69(29) |
| A 4 | 384(100) | 239(80), 224(23), 210(14), 208(25), 146(6), 145(7), 144(10), 130(14), 69(75) |
| A 5 | 368(60) | 223(100), 208(10), 180(4), 146(6), 145(7), 144(10), 130(10), 69(27) |
| A 6 | 384(100) | 239(80), 224(30), 210(20), 208(24), 146(8), 145(12), 144(13), 130(10), 69(90) |

1. Fragmente aller Oxindole



m/e 145

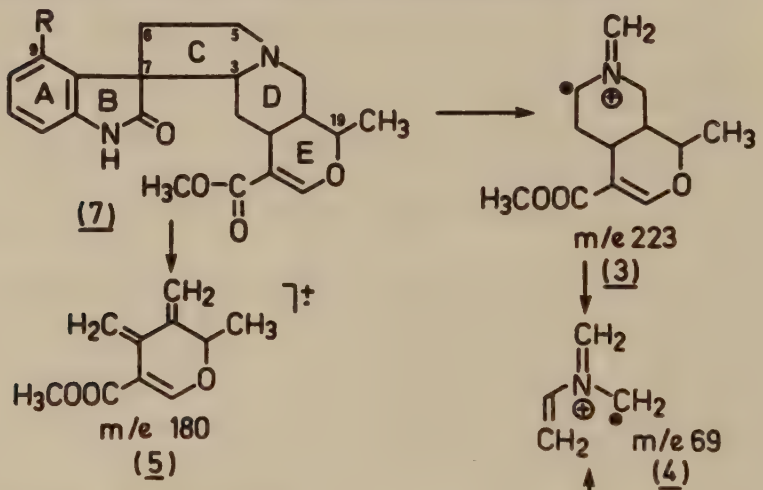
(1)



m/e 146

(2)

2. Fragmente der pentacyclischen Oxindolalkaloide (7)



m/e 223

(3)

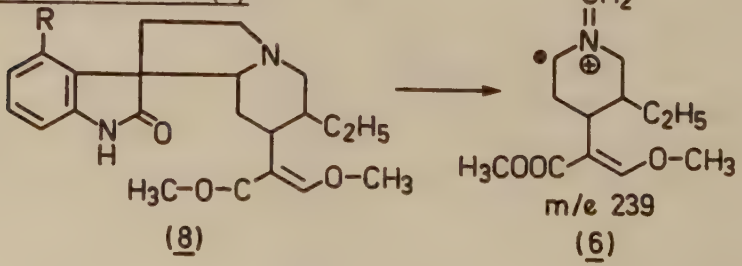
m/e 180

(5)

m/e 69

(4)

3. Fragmente der tetracyclischen Oxindolalkaloide (8)



m/e 239

(6)

Abb. 6

Fragmentionen in Massenspektren von Oxindolalkaloiden

Damit ist die Zuordnung der isolierten Substanzen in die genannten Oxindolgruppen möglich.
Bei den Alkaloiden A1, A2, A3 und A5 handelt es sich um pentacyclische Oxindole mit nicht substituiertem Ring A. A4 und A6 sind tetracyclische Oxindole mit ebenfalls unsubstituiertem Ring. Damit konnte das Vorliegen von tetracyclischen Oxindolen, wie z.B. Rotundifolin und Isorotundifolin ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse konnten durch die UV-Spektroskopie bestätigt werden. Die Spektren von allen sechs Alkaloiden waren mit $\lambda_{max}$ (MeOH) bei 208 nm, 243 nm und 283 nm praktisch identisch. Diese UV-Absorption ist typisch für unsubstituierte penta- und tetracyclische Oxindole, bedingt durch die vorliegenden Oxindol- und die Ester-Vinyl-Ether-Chromophoren.

## 4.2. Isomerisierung der isolierten Alkaloide

Die Alkaloide A1, A2 und A3 liefern praktisch identische MS-, UV-, IR- und 80 MHz NMR-Spektren und überschneiden sich teilweise in ihren $R_f$-Bereichen, so daß eine eindeutige Identifizierung nicht möglich ist. Durch Isomerisierungsversuche lassen sich die Substanzen jedoch den verschiedenen Oxindol-Konfigurationsreihen zuordnen, wodurch dann ihre Identität geklärt werden kann.

Die penta- und tetracyclischen Oxindolalkaloide besitzen vier Assymetriezentren, nämlich am C-3, C-7, C-15 und C-20 (Abb. 7, S. 48). Da alle bisher bekannten natürlich vorkommenden Oxindole das C-15-Wasserstoffatom α-ständig gebunden haben (136), beschränkt sich die Zahl der möglichen Isomeren auf acht.
Dabei werden die Stereoisomeren in Anlehnung an die Klassifizierung innerhalb der Yohimban-Serie als normal, pseudo, allo und epiallo bezeichnet, bezogen auf die Konfiguration am C-3 und C-20 (137). Die Benennung der Isomeren ist in Tabelle 7, S. 48, wiedergegeben.

Weiterhin unterscheiden sich die beiden Isomeren einer Serie in der Konfiguration am C-7. Die Isomeren, bei denen der Lactam-Kohlenstoff des Oxindolringes unterhalb der Ebene der Ringe C und D liegt, werden als A-Isomere jene mit der Lactam-Carbonylgruppierung über der C-D-Ring-Ebene als B-Isomere bezeichnet (137).

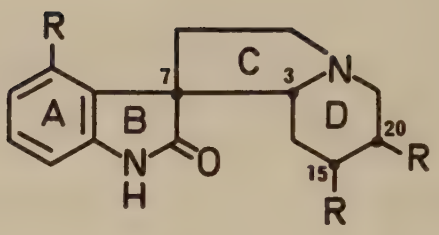



Abb. 7

Grundgerüst der penta- und tetracyclischen Oxindole

Tabelle 7: Mögliche Isomeren der penta- und tetracyclischen Oxindole

| | C-3 H | C-20 H |
|---|---|---|
| allo | α | α |
| epiallo | β | α |
| normal | α | β |
| pseudo | β | β |

In Anlehnung an die Cahn-Ingold-Prelog-Regel hat nach POISSON (138) das C-7-Atom der A-Serie die S-Konfiguration und in der B-Serie die R-Konfiguration.

Während Isomere der pseudo-Reihe aus sterischen Gründen zu instabil sind, um längere Zeit existieren zu können und sich schnell in die entsprechenden normal-Verbindungen umlagern, können die Oxindolalkaloide der normal, allo und epiallo-Serie genuin aus Pflanzenmaterial erhalten werden. Sie lassen sich allerdings unter basischen oder sauren Bedingungen am C-3 und/oder C-7 isomerisieren, wobei die

Gleichgewichtseinstellung durch Spaltung und Neuformierung der C-3 und C-7 Bindung erfolgt.

Dabei findet in der normal-Serie lediglich eine Änderung der Konfiguration am C-7 statt. Die umgesetzte Verbindung liegt dann nur mit ihrem A- bzw. B-Isomeren im Gleichgewicht vor. Isomerisierung am C-3 ist in dieser Reihe nicht möglich, da die entsprechenden Pseudo-Isomeren zu energiereich sind. Dagegen läßt sich ein Alkaloid der allo- und epiallo-Serie durch Isomerisierung am C-3 und C-7 mit allen vier möglichen Isomeren ins Gleichgewicht bringen.

Wir führten die Isomerisierungen im Mikromaßstab nach einer Modifikation von SEATON (139) in Pyridin durch.

Während aus A1 und A2 identische DC-Bilder mit jeweils vier Isomerisierungsprodukten erhalten werden konnten, ergab A3 lediglich zwei Alkaloide. Durch Vergleich der $R_f$-Werte der gebildeten Substanzen konnten nun alle drei Alkaloide identifiziert werden. Die von uns erhaltenen Ergebnisse stimmten mit Literaturangaben überein.

Die Alkaloide Isopteropodin (A1) und Pteropodin (A2) aus der allo-Serie lieferten das allo-Isomere Isopteropodin als Hauptprodukt, in geringeren Konzentrationen waren Pteropodin und die epiallo-Isomeren Speciophyllin und Uncarin E nachzuweisen (140,141). Isomitraphyllin (A3) aus der normal-Reihe ergab nur ein Gemisch der entsprechenden A- und B-Isomeren, in diesem Fall Isomitraphyllin und Mitraphyllin, wobei Isomitaphyllin das Hauptprodukt darstellte (142,143). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß bei dem B-Isomeren Mitraphyllin die oberhalb der Ringe C und D liegende Lactamgruppierung von den freien Elektronen des Stickstoffs abgestoßen wird, wodurch eine solche Konfiguration nicht so stabil ist wie bei dem entsprechenden A-Isomeren Isomitraphyllin, bei dem die Lactamgruppierung in weiterer räumlicher Entfernung vom Stickstoff liegt.

## 4.3. Identifizierung der isolierten Alkaloide

Durch die vorliegenden Untersuchungsergebnisse konnten wir nun die sechs isolierten Substanzen identifizieren (Tab. 8, S. 51).

Die erhebliche Abweichung des $[\alpha]_D$-Wertes von A1 (Isopteropodin) von den Literaturwerten führten wir darauf zurück, daß A1 durch das schwer abtrennbare Pteropodin und in Spuren mit dem Isomerisierungsprodukt Speciophyllin verunreinigt ist. JOHNS (143) bestimmte 1966 die $[\alpha]_D$-Werte für Pteropodin mit $-103^{\circ}$ und für Speciophyllin mit $+74^{\circ}$.

Die Formeln der isolierten Alkaloide sind in Abb. 8, S. 52, wiedergegeben.

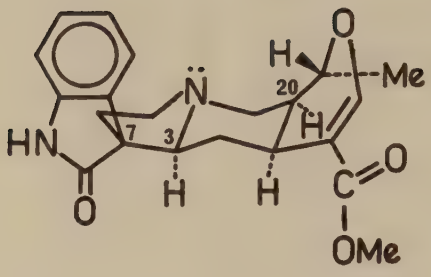
Das von uns gefundene Alkaloidmuster stimmte mit der von HEMINGWAY 1974 (128) ermittelten Alkaloidzusammensetzung der Blätter und Stengel von Uncaria tomentosa nur teilweise überein. Isorhynchophyllin und Rhynchophyllin waren, wie in der Literatur beschrieben, die Hauptalkaloide. Isomitraphyllin und Mitraphyllin ließen sich als Nebenalkaloide isolieren. Nicht nachweisbar waren Dihydrocorynanthein, Hirsutin, Hirsutein, Isorotundifolin, Rotundifolin und Alkaloid-N-Oxide. Isopteropodin und Pteropodin als weitere Nebenalkaloide sind dagegen bisher noch nicht in Uncaria tomentosa beschrieben worden.

Die isolierten Substanzen wurden in die Hydrochloride überführt und im Granulozytentest auf ihre immunologische Wirksamkeit untersucht.

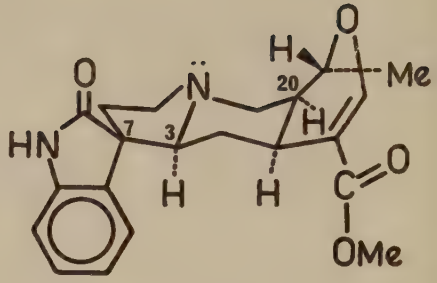
Die Ergebnisse finden sich im pharmakologischen Teil dieses Kapitels.

Tabelle 8: Zuordnung der isolierten Substanzen zu bekannten Oxindolalkaloiden

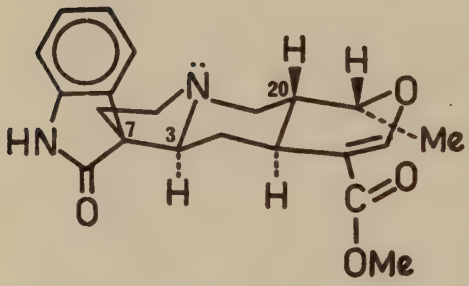
| isoliertes Alkaloid | Smp. °C | | $[\alpha]_D$ ($CHCL_3$) | |
|---|---|---|---|---|
| | gef. | Lit. | gef. | Lit. |
| A1: Isopteropodin (pentacyclisch, allo-Serie, Isomer A) | 204-209 | 209-211 (143) | -85.1 | - 96 (140)<br>-111 (143) |
| A2: Pteropodin (pentacyclisch, allo-Serie, Isomer B) | 214-219 | 217-219 (143,144) | - | -103 (143) |
| A3: Isomitraphyllin (pentacyclisch, normal-Serie, Isomer A) | 96-105 (Z) | Zersetzung (145) | +14.5 | + 18 (143,146) |
| A4: Isorhynchophyllin (tetracyclisch, normal-Serie, Isomer A) | 138-141 | 144 (147) | + 7.8 | + 8.6 (147) |
| A5: Mitraphyllin (pentacyclisch, normal-Serie, Isomer B) | 264-268 | 270 (143)<br>265-266 (145) | - 4.3 | - 9.8 (143)<br>- 7.0 (146) |
| A6: Rhynchophyllin (tetracyclisch, normal-Serie, Isomer B) | 214-216 | 212-214 (147) | -15.1 | -14.4 (147) |



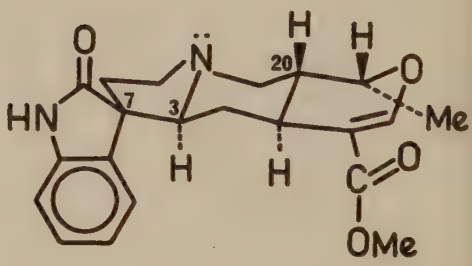
Isopteropodin



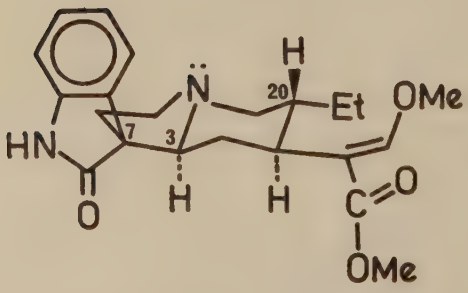
Pteropodin



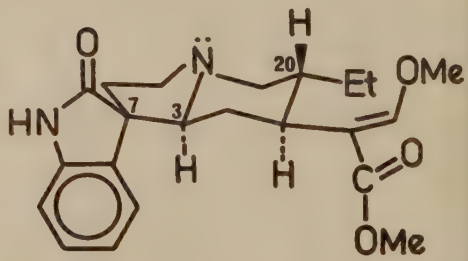
Isomitraphyllin



Mitraphyllin



Isorhynchophyllin



Rhynchophyllin

Abb. 8

Alkaloide der Wurzel von Uncaria tomentosa, braune Varietät

## C. DC- und HPLC-Screening südamerikanischer Uncaria-Pflanzen

Nachdem erstmalig der Nachweis einer immunstimulierenden Wirkung von Uncaria-Alkaloiden erbracht war (siehe D. 1.1. dieses Kapitels, S. 65), interessierte, ob und wie weit diese Wirkung von dem Alkaloidmuster bzw. dem Alkaloidgehalt von Uncaria-Drogen abhängig ist. Hierfür war die Ausarbeitung eines schnell durchführbaren Screening-Verfahrens zur Ermittlung des Alkaloidmusters einer Pflanzenprobe erforderlich.

### 1. Bisherige Analytik von Uncaria-Alkaloiden

Für eine qualitative Übersicht sind alle bisher für die DC von Indolalkaloiden beschriebenen Trennsysteme (130) nur bedingt verwendbar, da die $R_f$-Bereiche der Alkaloide sich teilweise überschneiden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Kieselgel-DC: $R_f$-Werte von Uncaria-Alkaloiden

| | LM I | LM II | LM III |
|---|---|---|---|
| Hirsutin | 0.10 | 0.11 | 0.21 |
| Isomitaphyllin | 0.71 | 0.47 | 0.80 |
| Mitraphyllin | 0.55 | 0.39 | 0.50 |
| Isopteropodin | 0.73 | 0.48 | 0.83 |
| Pteropodin | 0.72 | 0.47 | 0.81 |
| Speciophyllin | 0.29 | 0.26 | 0.21 |
| Isorhynchophyllin | 0.71 | 0.42 | 0.70 |
| Rhynchophyllin | 0.36 | 0.25 | 0.31 |

Eigene Optimierungsversuche durch stufenweise Entwicklung in verschiedenen Laufmittelsystemen oder durch Verwendung von HPTLC-Platten brachten keine wesentlichen Verbesserungen.

Die von SHELLARD beschriebenen quantitativen Bestimmungsmethoden mittels UV-Spektroskopie (148), Kolorimetrie (149)

und Densiometrie (150) setzen jeweils eine Trennung des Alkaloidgemisches in die Einzelsubstanzen voraus, was für ein Screening-Verfahren zu aufwendig ist.

Die Gaschromatographie zur qualitativen und quantitativen Erfassung von Substanzen konnte wegen der Isomerisierung der Indolalkaloide durch Wärmeeinwirkung nicht verwendet werden.

Eine von PHILLIPSON (151) vorgeschlagene Trennung durch HPLC auf einer 5 µm Spherisorb ODS-Säule mit Methanol-Wasser (80:20) oder Acetonitril-1%iger Ammoniumcarbonat-Lösung (60:40) als mobiler Phase eignete sich zwar zur Trennung der Reinsubstanzen, erwies sich aber für ein Gemisch mit unterschiedlicher Alkaloidkonzentration als ungeeignet. Eigene Versuche auf einer C-18 µ-Bondapak-Säule mit verschiedenen Acetonitril-Wasser- bzw. Methanol-Wasser-Gemischen brachten keine Verbesserung in der Auftrennung (siehe Exp.Teil II. 2.6., S. 124).

## 2. Ionenpaarchromatographie von Uncaria-Alkaloiden

Im folgenden setzten wir die bisher für diese Verbindungsklasse noch nicht beschriebene Ionenpaarchromatographie ein (152-154).

Die HPLC-Trennungen der Alkaloidgemische wurden mit der käuflichen Lösung PIC B7 (Waters) durchgeführt. Als Ionenpaarbildner dient das Na-Salz der Heptansulfonsäure, der Säurezusatz erfolgt in Form von Essigsäure.

Die unter diesen Bedingungen für Uncaria-Alkaloide optimalen Trennparameter und die durchschnittlichen Rt-Zeiten der Einzelsubstanzen sind in Tabelle 10, S. 55, angegeben. Die HPLC-Chromatogramme von Alkaloidmodellmischungen finden sich in Abbildung 9, S. 56.

Tabelle 10: Ionenpaarchromatographie von Uncaria-Alkaloiden

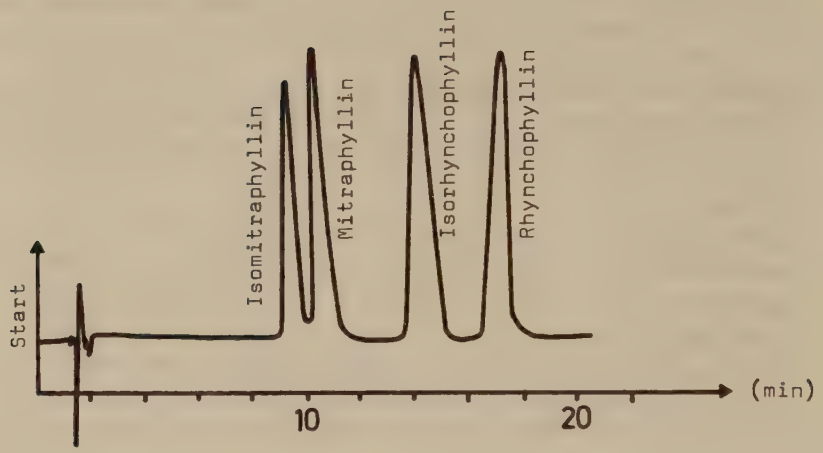
a) Retentionszeiten von penta- und tetracyclischen Oxindolen in Trennsystem I

| Alkaloid | Rt (min) |
|---|---|
| Isomitraphyllin | 9.2 |
| Mitraphyllin | 10.4 |
| Isopteropodin | 8.8 |
| Pteropodin | 9.8 |
| Speciophyllin | 11.1 |
| Isorhynchophyllin | 13.9 |
| Rhynchophyllin | 17.3 |

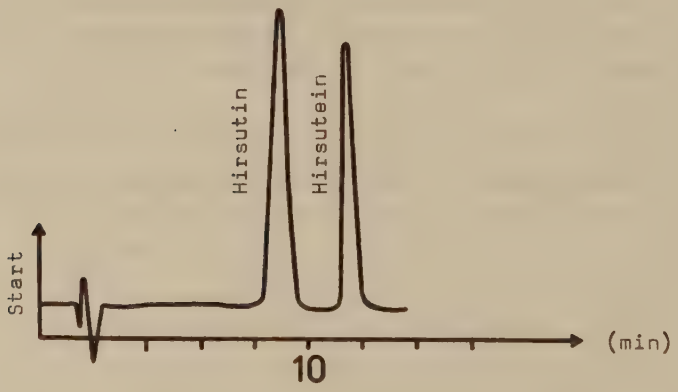
b) Retentionszeiten von tetracyclischen Heteroyohimbinen in Trennsystem II

| Alkaloid | Rt (min) |
|---|---|
| Hirsutin | 9.1 |
| Hirsutein | 11.0 |

Geräte- und Trennparameter für a) und b): s.Exp.Teil II. 1.8., S. 118




a) Chromatogramm einer Modellmischung aus Oxindolalkaloiden in TS I




b) Chromatogramm einer Modellmischung aus tetracyclischen Heteroyohimbinen in TS II

Geräte- und Trennparameter für a) und b): s.Exp.Teil II.1.8.,S.

Abb. 9

Ionenpaarchromatographie von Uncaria-Alkaloiden

## 3. Qualitatives und quantitatives Alkaloid-Screening von Uncaria-Arten

Untersucht wurden die drei von KEPPLINGER (115) beschriebenen Varietäten von Uncaria tomentosa, die sich je nach Färbung des Bastes in eine braune, rote oder weiße Subspecies unterteilen lassen. Daneben wurde zusätzlich das Alkaloidmuster einer Drogenprobe von Uncaria guainensis ermittelt. Bei allen Pflanzen wurde das Screening mit Blättern, Stengeln und Wurzeln getrennt durchgeführt.

Die Aufarbeitung der Drogenmuster ist aus dem nachfolgenden Schema (Abbildung 10, S. 58) ersichtlich.

### 3.1. DC-Screening

Die ausgeschüttelten Ethylacetat-Extrakte wurden in LM I und LM II chromatographiert, die Platten im UV 254 nm und UV 366 nm betrachtet und mit Dragendorff-Eisen-III-chlorid-Perchlorsäure bzw. Ehrlichs Reagens besprüht. Durch die Verwendung verschiedener Detektionsmittel erreicht man eine erste Differenzierung der Indolalkaloide (s.Exp.Teil II. 1.6., S. 116) und erhält Hinweise für den Einsatz geeigneter HPLC-Systeme.

Zur Prüfung auf eventuell vorhandene N-Oxide wurde der durch Schichtchromatographie isolierte Startbereich des in LM I entwickelten methanolischen Gesamtextrakts auf eine mit Serdoxit-Harz beschickte Säule (133) gegeben, mit Methanol eluiert und durch Säure-Base-Ausschüttelung nach Abb. 10, S. 58, aufgearbeitet. Eine positive Alkaloidreaktion der organischen Phase zeigt das Vorliegen von N-Oxiden in dem untersuchten Pflanzenmaterial an.

Die Ergebnisse der DC-Untersuchung sind in Tabelle 11, S. 60, wiedergegeben. Danach ließen sich lediglich Oxindolalkaloide in ihrer oxidierten Form nachweisen.

Schema zur analytischen Untersuchung von Uncaria-Drogenmustern

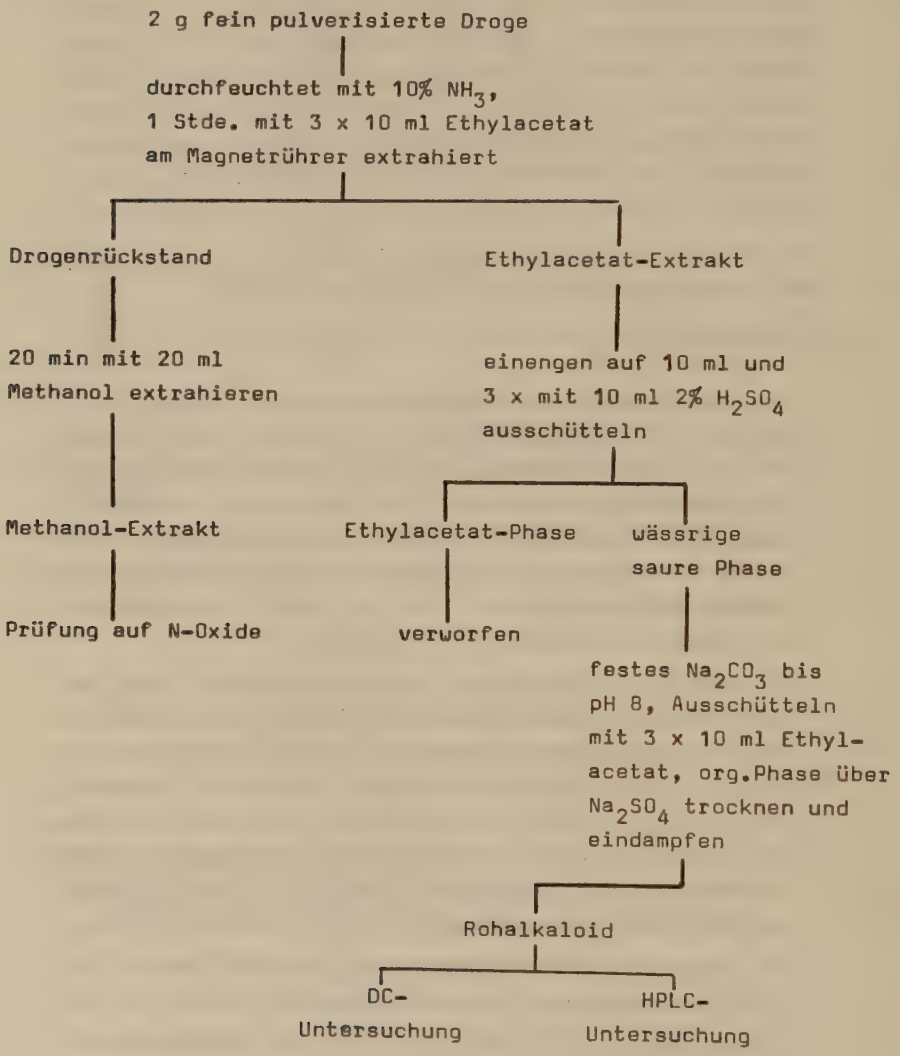



Abb. 10

## 3.2. HPLC-Screening

Das nach Abbildung 10,S.58, erhaltene Rohalkaloidgemisch wurde zu einer 1%igen Lösung in Methanol aufgenommen und davon jeweils 20 µl pro Analysendurchlauf chromatographiert. Das im Handel erhältliche Oxindolalkaloid Gelsemin diente als Bezugssubstanz (Abb. 11, S. 61).

Bei Drogenmustern, in denen durch das Vorliegen hoher Konzentrationen von Isopteropodin,Isomitraphyllin oder Mitraphyllin Gefahr bestand, daß kleinere Mengen von Alkaloiden im selben Rt-Bereich im Chromatogramm überdeckt wurden, kombinierten wir die HPLC-Methode mit der Dünnschichtchromatographie.
Dazu wurden die Proben mehrere Male durch HPLC aufgetrennt und der fragliche Peak aufgefangen. Nach einer Säure-Basen-Ausschüttelung wurden die Alkaloide auf HPTLC-Platten zusammen mit Vergleichssubstanzen entwickelt und mit Dragendorff-Reagens und 10%iger $NaNO_2$-Lösung zur Intensivierung der Färbung besprüht. Durch Vergleich der $R_f$-Werte konnte nun die Peakzusammensetzung eindeutig geklärt werden (Abb. 12, S. 62).

Durch Integration der Peakflächen konnte die relative Peakfläche jedes Alkaloids berechnet werden (siehe Exp. Teil II. 2.7., S. 125).

Wir erhielten so von jeder Droge einen typischen "Alkaloidfingerprint".

Die Ergebnisse sind in Tabelle 12, S. 63, zusammengefaßt.

Tabelle 11: Ergebnisse des DC-Screenings

| Drogenmuster | Oxindolalkaloide | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Gruppe I | | Gruppe II | | Gruppe III | |
| | a | b | a | b | a | b |
| **Uncaria tomentosa** | | | | | | |
| braune Varietät | | | | | | |
| Blatt | + | - | + | ++ | + | + |
| Stengel | + | - | + | + | - | (+) |
| Wurzel | +++ | + | + | + | - | (+) |
| weiße Varietät | | | | | | |
| Blatt | + | - | ++ | +++ | ++ | ++ |
| Stengel | - | - | ++ | + | ++ | + |
| Wurzel | + | + | +++ | ++ | ++ | ++ |
| rote Varietät | | | | | | |
| Wurzel | + | | +++ | | ++ | |
| **Uncaria guainensis** | | | | | | |
| Blatt | | ++ | | + | | - |
| Stengel | | ++ | | + | | - |
| Wurzel | | + | | + | | + |

Drogenmuster: a = gesammelt im August 1981
b = gesammelt im Juni 1983

\+ = Dragendorff-Färbung schwach
++ = Dragendorff-Färbung mittel
+++ = Dragendorff-Färbung stark

Die Oxindolalkaloide werden auf Grund ihrer ähnlichen $R_f$-Werte in 3 Gruppen zusammengefaßt:

Gruppe I : Isopteropodin, Pteropodin, Isomitraphyllin
Gruppe II : Mitraphyllin, Isorhynchophyllin
Gruppe III: Rhynchophyllin

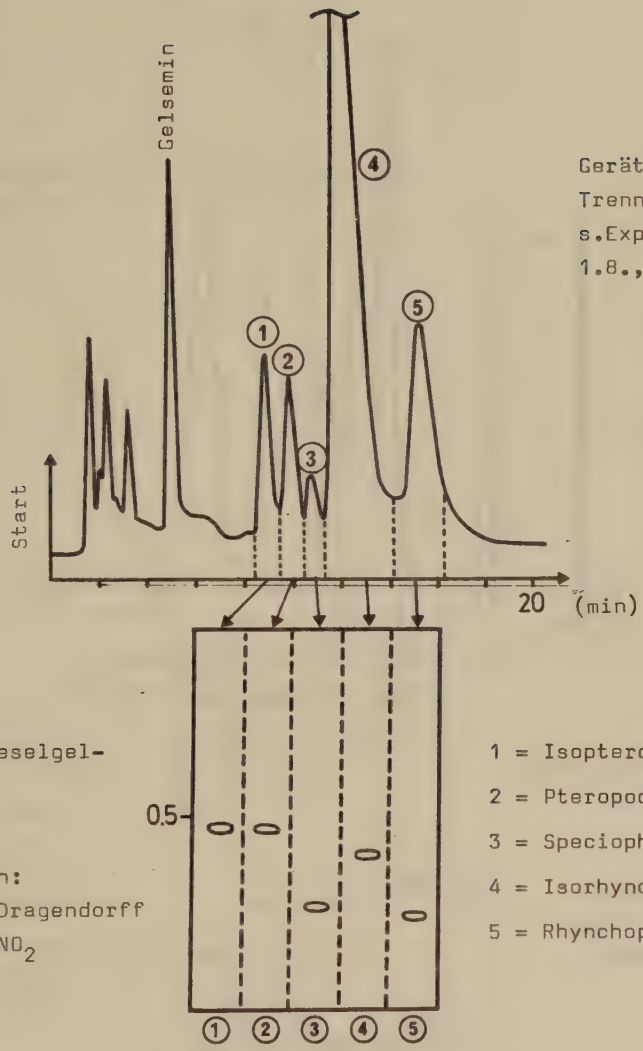



Abb. 11

Ionenpaar-HPLC des Alkaloidgemisches aus der Wurzel von Uncaria tomentosa, weiße Varietät (1983)

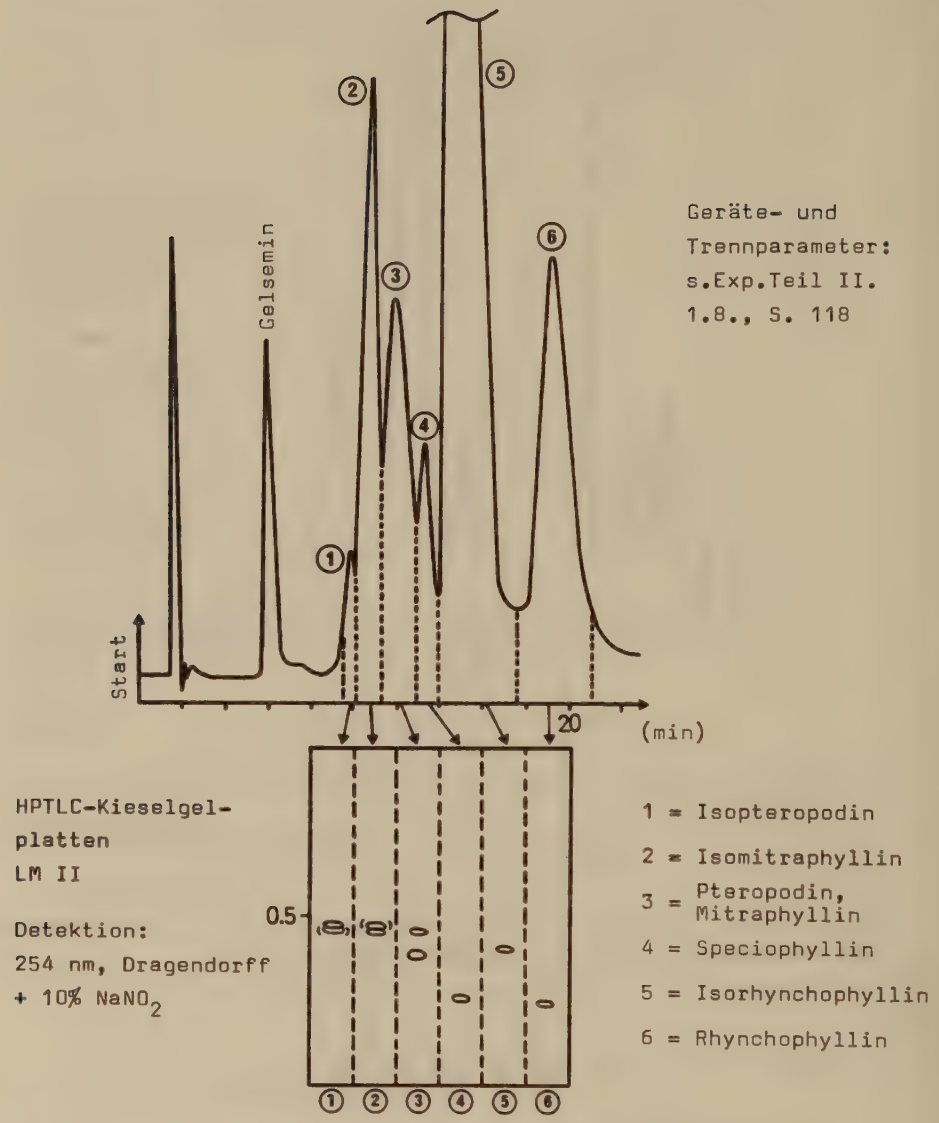



Abb. 12
Ionenpaar-HPLC des Alkaloidgemisches aus der Wurzel von
Uncaria tomentosa, weiße Varietät (1981)

Tabelle 12: HPLC-Analyse südamerikanischer Uncaria-Arten

| | Isopteropodin | Isomitraphyllin | Pteropodin | Mitraphyllin | Speciophyllin | Isorhynchophyllin | Rhynchophyllin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 31.8 | 3.0 | 4.2 | 27.4 | - | 21.3 | 7.6 |
| 2 | - | 5.7 | - | 20.1 | - | 49.7 | 21.1 |
| 3 | - | 55.9 | - | 40.9 | - | - | - |
| 4 | - | - | - | - | - | 64.1 | 31.6 |
| 5 | 53.5 | - | 28.7 | - | - | 4.5 | 8.6 |
| 6 | 40.0 | - | 13.8 | - | - | 26.7 | 14.8 |
| 7 | 15.4 | Spuren | - | 5.4 | - | 48.2 | 25.0 |
| 8 | - | 2.7 | - | 33.9 | - | 38.1 | 19.6 |
| 9 | - | - | - | - | - | 67.6 | 26.1 |
| 10 | - | - | - | - | - | 57.1 | 39.4 |
| 11 | 3.3 | 16.5 | 9.6 | 9.3 | 6.3 | 40.6 | 11.6 |
| 12 | 12.2 | - | 11.2 | - | 4.7 | 53.8 | 14.3 |
| 13 | 21.8 | 16.7 | 7.3 | 5.0 | - | 36.1 | 9.8 |
| 14 | - | 63.1 | - | 21.2 | - | 5.0 | 5.8 |
| 15 | - | 53.7 | - | 23.4 | - | 6.1 | 11.9 |
| 16 | 43.4 | 33.6 | - | 12.7 | - | Spuren | 5.5 |

| | Unc.tom./braun | | Unc.tom./weiß | | Unc.tom./rot | Unc.guain. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1981 | 1983 | 1981 | 1983 | 1981 | 1983 |
| Blatt | 1 | 2 | 7 | 8 | | 14 |
| Stengel | 3 | 4 | 9 | 10 | | 15 |
| Wurzel | 5 | 6 | 11 | 12 | 13 | 16 |

## 4. Zusammenfassung und Diskussion der Screening-Untersuchungen

Die tetracyclischen Oxindole Isorhynchophyllin und Rhynchophyllin sind in fast allen Drogenmustern vertreten. In Uncaria tomentosa stellen sie in der Regel die Hauptalkaloide dar. In Uncaria guainensis sind die Nebenalkaloide, während hier Mitraphyllin und Isomitraphyllin als Hauptalkaloide fungieren. Die Stengel aller Uncaria-Arten weisen mit 0.4% - 0.5% durchweg einen niedrigeren Alkaloidgehalt auf und führen meist nur ein Isomerenpaar. Dagegen zeigen Wurzeln und Blätter neben einem höheren Alkaloidgehalt (0.7% - 1% des eingesetzten Trockenmaterials) auch die größere Alkaloidvielfalt.

Während HEMINGWAY (128) in früheren Untersuchungen neben Oxindolalkaloiden auch Indolalkaloide wie Hirsutin, Hirsutein und Dihydrocorynanthein sowie die N-Oxide mehrerer der tertiären Alkaloide fanden, konnten wir lediglich Oxindole in ihrer reduzierten Form nachweisen.

Unsere Beobachtungen decken sich aber mit den Untersuchungsergebnissen von LAVAULT (155), der in einem 1978 gesammelten Exemplar von Uncaria guainensis ebenfalls keine tetracyclischen Heteroyohimbine und auch keine N-Oxide isolieren konnte. Solche Resultate bei Untersuchungen innerhalb der Uncaria-Arten sind aber nichts Außergewöhnliches, veränderte Alkaloidmuster innerhalb einer Species wurden häufiger beobachtet (156-160).

Als Ursachen kommen in Frage: Verwechslungen der morphologisch sehr ähnlichen Uncaria-Arten, das Vorliegen ökologischer oder chemischer Rassen (161) und zeitliche Vegetationsunterschiede, bedingt durch den artspezifischen Biosyntheserhythmus (162,163). Die Indolalkaloide bilden die biosynthetischen Vorstufen für die entsprechenden Oxindolalkaloide, wobei diese dann enzymatisch weiter isomerisieren. Dabei kann der Gehalt an ursprünglich vorhandenen Indolalkaloiden so weit absinken, daß sie nicht mehr nachweisbar sind (161,164).

## D. Immunologische Untersuchungen

### 1. Granulozyten- und Chemilumineszenz-Test

#### 1.1. Lokalisation des Wirkprinzips, Untersuchung der Alkaloide

Zur Lokalisation des Wirkprinzips testeten wir zunächst Wasser- und Ethanolextrakte der Uncaria tomentosa-Wurzel (braune Varietät). Zusätzlich wurden Wasser- und Ethanolextrakte aus mit $NH_3$ alkalisiertem Drogenpulver hergestellt, nachdem vorher eine Stimulation durch $NH_3$ allein ausgeschlossen werden konnte. Die mit n-Hexan, Chloroform und n-Butanol hergestellten lipophilen Extrakte wurden in DMSO gelöst und gegen einen DMSO-Blindwert getestet. Der Nachteil bei Verwendung von DMSO besteht darin, daß der Lösungsvermittler bis zu einer Konzentration von $10^{-5}$% selbst zwischen 20% und 30% stimulierend wirkt und daher die Eigenstimulation des Testextraktes überdecken kann.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 13 wiedergegeben.

Tabelle 13: Prozentuale Phagozytosesteigerung verschiedener Extrakte aus Uncaria tomentosa (braun) im Granulozytentest

| | $10^{-1}$% | $10^{-2}$% | $10^{-3}$% | $10^{-4}$% | $10^{-5}$% |
|---|---|---|---|---|---|
| $H_2O$-Mazerat | - | 7.3 | 21.8 | 24.1 | 5.7 |
| $H_2O$-Mazerat ($NH_3$) | - | 15.6 | 12.9 | 29.6 | 28.4 |
| EtOH-Mazerat | - | - | 14.4 | 12.0 | 26.3 |
| EtOH-Mazerat ($NH_3$) | - | 7.6 | 35.6 | 36.8 | 25.5 |

Obwohl nicht auszuschließen ist, daß in der Droge mehrere Wirkprinzipien vorliegen, scheinen die Alkaloide nach den Ergebnissen der Tabelle 13, S. 65, zumindest an einer immunologischen Wirkung beteiligt zu sein. Die alkalisierten Auszüge, die einen höheren Alkaloidgehalt als die Extrakte aus nicht vorbehandelter Droge aufweisen, zeigten im Durchschnitt eine höhere Steigerungsrate als die nicht alkalisierten Extrakte.

Die Untersuchung des Rohalkaloidgemisches in der wasserlöslichen Hydrochloridform bestätigte diese Annahme.
Die durchschnittliche Phagozytosesteigerung von 20% für das Rohalkaloidgemisch war allerdings nicht ganz so hoch wie die des ethanolischen Gesamtextraktes. Daraus scheint hervorzugehen, daß den im wässrigen und ethanolischen Extrakt vorhandenen Begleitstoffen eine Adjuvans-Rolle im Sinne einer Wirkungssteigerung zukommt. Diese Beobachtung wurde in unserem Arbeitskreis auch bei anderen Substanzklassen gemacht (165).
Bei Uncaria tomentosa konnte dies später in anderen Testmodellen bestätigt werden.

Innerhalb der aus dem Alkaloidgemisch isolierten Reinalkaloide waren deutliche Wirkunterschiede festzustellen, obwohl die Wirkmaxima übereinstimmend im Konzentrationsbereich von $10^{-2}$% - $10^{-5}$% lagen. Die im Granulozytentest nach BRANDT gefundenen Ergebnisse (Tabelle 14, S. 67) wurden durch den Chemilumineszenztest (Tabelle 15, S. 68 und Abb. 13, S. 69) weitgehend bestätigt. Die Ursache für einzelne Abweichungen zwischen den beiden Testergebnissen (z.B. bei Isorhynchophyllin) konnte noch nicht geklärt werden.

Durch die Ergebnisse der Tabellen 14 und 15 (S.67 u. 68) kann als gesichert gelten, daß einige aus Uncaria tomentosa isolierte Alkaloide die Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten in vitro steigern, wobei Isopteropodin die deutlich stärkste Wirkung aufweist. Inwieweit auch andere Indolalkaloide eine immunologische Wirkung zeigen, wird im letzten Teil der Arbeit untersucht (siehe Kapitel 6, 1.1., S. 101).

Tabelle 14: Prozentuale Phagozytosesteigerung des Rohalkaloidgemisches und der isolierten Alkaloide aus der Wurzel von Uncaria tomentosa im Granulozytentest

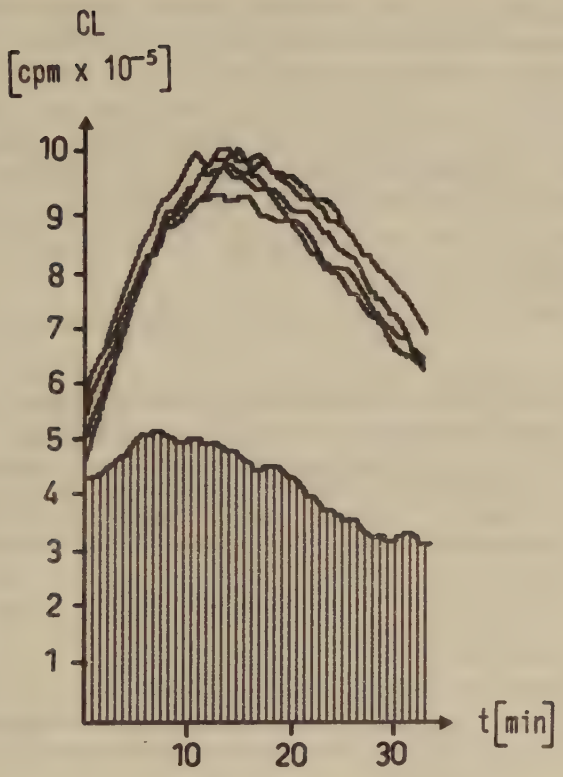
| Alkaloid-HCl | $10^{-1}$% | $10^{-2}$% | $10^{-3}$% | $10^{-4}$% | $10^{-5}$% | $10^{-6}$% | $10^{-7}$% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Alkaloidgemisch | cyt. | 20.1 | 21.0 | 15.7 | 10.3 | - | - |
| Isopteropodin | cyt. | 23.4 | 48.7 | 55.0 | 38.2 | 28.2 | 13.6 |
| Pteropodin | cyt. | 11.2 | 21.7 | 26.1 | 23.0 | - | - |
| Isomitraphyllin | cyt. | 16.5 | 27.0 | 27.0 | 19.4 | 5.7 | - |
| Isorhynchophyllin | cyt. | 10.8 | 25.2 | 27.3 | 16.1 | 8.8 | - |
| Mitraphyllin | - | - | - | - | - | - | - |
| Rhynchophyllin | - | - | - | - | - | - | - |

Die gefundenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens zwei Testungen pro Substanzkonzentration.
cyt. = cytotoxisch, Substanz lysiert Granulozyten

Tabelle 15: Prozentuale Steigerung der CL-Antwort des Rohalkaloidgemisches und der isolierten Alkaloide aus der Wurzel von Uncaria tomentosa

| Alkaloid-HCl | $10^{-2}$% | $10^{-3}$% | $10^{-4}$% | $10^{-5}$% | $10^{-6}$% | $10^{-7}$% | $10^{-8}$% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Alkaloidgemisch | - | 31.5 | 35.5 | 75.2 | 33.2 | - | - |
| Isopteropodin | - | 67.2 | 66.0 | 55.7 | 68.1 | 55.3 | 31.2 |
| Pteropodin | - | 10.6 | 10.0 | 23.7 | 15.4 | - | - |
| Isomitraphyllin | - | 15.4 | 15.7 | 36.1 | 46.7 | 18.6 | - |
| Isorhynchophyllin | - | - | - | - | - | - | - |
| Mitraphyllin | - | - | - | - | - | - | - |
| Rhynchophyllin | - | - | - | - | - | - | - |

Die gefundenen Werte beim Alkaloidgemisch und bei Isopteropodin sind Mittelwerte aus mindestens zwei Messungen pro Substanzkonzentration.




| Kanal | Konzentration (%) | Peak-Maximum (cpm x $10^{-5}$) | $t_{max}$ (min) | Steigerung der CL-Antwort (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Kontrolle | 5.08 | 6.6 | - |
| 2 | $10^{-3}$ | 9.99 | 14.6 | 96.7 |
| 3 | $10^{-4}$ | 9.75 | 14.0 | 92.0 |
| 4 | $10^{-5}$ | 10.02 | 12.6 | 97.2 |
| 5 | $10^{-6}$ | 9.80 | 17.3 | 93.0 |
| 6 | $10^{-7}$ | 9.25 | 14.6 | 82.0 |

Abb. 13

Steigerung der CL-Antwort durch Isopteropodin

## 1.2. Immunologische Screening-Untersuchung verschiedener südamerikanischer Uncaria-Arten

Die aus mit $NH_3$ alkalisiertem Pflanzenmaterial gewonnenen Ethanolmazerate aller im HPLC-Screening verwendeten Drogenmuster südamerikanischer Uncaria-Arten wurden in Konzentrationen von $10^{-2}$% und $10^{-3}$% , die Wurzelextrakte zusätzlich in einer Verdünnung von $10^{-4}$%, im Granulozytentest untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 wiedergegeben.

Tabelle 16: Prozentuale Phagozytosesteigerung verschiedener Uncaria-Drogenmuster im Granulozytentest

| | Unc.tom./braun | | Unc.tom./weiß | | Unc.guain. |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1981 | 1983 | 1981 | 1983 | 1983 |
| Blatt | 1 | 2 | 7 | 8 | 13 |
| Stengel | 3 | 4 | 9 | 10 | 14 |
| Wurzel | 5 | 6 | 11 | 12 | 15 |

| Extrakt | $10^{-2}$% | $10^{-3}$% | $10^{-4}$% |
|---|---|---|---|
| 1 | 30.7 | 36.5 | |
| 2 | 13.0 | 18.1 | |
| 3 | 15.2 | 11.8 | |
| 4 | - | 19.4 | |
| 5 | 28.6 | 31.7 | 20.8 |
| 6 | 60.5 | 30.7 | 23.0 |
| 7 | 32.9 | 39.2 | |
| 8 | 9.2 | 15.2 | |
| 9 | 11.7 | 8.8 | |
| 10 | 4.1 | 23.2 | |
| 11 | 35.3 | 38.7 | 39.7 |
| 12 | 13.0 | 26.2 | 23.7 |
| 13 | 27.1 | 14.3 | |
| 14 | 21.0 | 11.9 | |
| 15 | 15.2 | 39.4 | 20.8 |

Die gefundenen Phagozytosesteigerungen der einzelnen Proben bestätigten erneut, daß die Alkaloide maßgeblich an der immunologischen Aktivität der Drogen beteiligt sind.

Stengelextrakte der untersuchten Uncaria-Species, die alle niedrige Alkaloidgehalte besitzen, zeigten mit durchschnittlichen Steigerungsraten zwischen 10% und 20% keine starke Phagozytoseaktivierung.
Im Gegensatz dazu wiesen die isopteropodinführenden Wurzeln Werte zwischen durchschnittlich 30% und 40% Aktivitätszuwachs auf.

Die Blätter mit ähnlich hohen Alkaloidkonzentrationen wie die Wurzeln boten ein differenziertes Bild. Während die Exemplare der Ernte von 1983, die kein Isopteropodin führten, nur etwas höhere Stimulationswerte als die Stengel erreichten, konnten wir bei den 1981 geernteten Blättern wiederum Steigerungsraten zwischen 30% und 40% erhalten. Diese Blätter enthielten Isopteropodin in etwa gleicher Konzentration wie die Wurzeln.

Neben dem Alkaloidgehalt der Droge hängt daher die Wirksamkeit auch von dem Alkaloidmuster ab, wobei die unterschiedlichen Phagozytosesteigerungsraten der Einzelalkaloide im Gesamtergebnis erkennbar wurden.

2. In-vivo-Untersuchungen: Carbon-Clearance-Test, Prüfung auf immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung

Die Resultate aller von uns getesteten Proben im Carbon-Clearance-Test nach BIOZZI sind in Tabelle 17, S. 72, zusammengefaßt.

Wie im Granulozytentest ist auch in diesem Test die Beteiligung der Alkaloide an der Wirksamkeit erkennbar. Ein alkaloidhaltiges wässriges Mazerat stimuliert das RES stärker als ein alkaloidarmes wässriges Mazerat. Wurde das Alkaloidgemisch zusammen mit Catechin, das selbst nicht stimuliert, appliziert, erhielten wir eine ähnlich hohe Aktivitätssteigerung wie beim wässrigen Mazerat.

Tabelle 17: Carbon-Clearance-Test mit Substanzen aus der Wurzel von Uncaria tomentosa (braune Varietät)

| Probe | Dosis | Applikation | Regressions-koeffizient K | $\frac{K_{Subst.}}{K_{Kontrolle}}$ |
|---|---|---|---|---|
| alkaloidhaltiges wässriges Mazerat | 10 mg/kg | i.p. 1 x 24 Stdn. vor Testbeginn | -0.050 | 2.3 |
| alkaloidarmes, wässriges Mazerat | 10 mg/kg | i.p. 1 x 24 Stdn. vor Testbeginn | -0.046 | 1.7 |
| Alkaloidgemisch-HCl | a) 0.1 mg/kg<br>b) 0.001 mg/kg | i.p., 5 x, letzte Dosis 24 Stdn. vor Testbeginn | a) -0.017<br>b) -0.037 | a) 0.3<br>b) 0.7 |
| Alkaloidgemisch zusammen mit einem wässrigen Catechin-extrakt (168) | 10 mg + 1 mg/kg | i.p. 1 x 24 Stdn. vor Testbeginn | -0.060 | 2.2 |
| wässriger Catechin-extrakt | 10 mg/kg | i.p. 1 x 24 Stdn. vor Testbeginn | -0.021 | 1.0 |

Das Alkaloidgemisch allein hatte bei Konzentrationen von 0.1 mg/kg bis 0.001 mg/kg (5malige Gabe i.p.) eine suppressive Wirkung auf das RES-System, und zwar um so stärker, je höher die Dosis gewählt wurde. Diese Resultate decken sich mit Untersuchungen der Fa.Hoffmann-La Roche (Basel), in denen eine signifikante immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung des Rohalkaloidgemisches festgestellt werden konnte, und zwar sowohl bei subcutaner als auch bei peroraler Gabe. Als Modelle dienten dabei das Carragenin-Pfotenödem an Ratten (Wirkung gegen exsudative Prozesse) und der Adjuvans-Arthritis-Test (Wirkung gegen primär chronischer Polyarthritis ähnlichen Prozessen) (166). In beiden Versuchsanordnungen wurden Wirkungen gemessen, die etwas schwächer waren als die von bekannten Antiphlogistika und/oder Immunsuppressiva (s.Tab.18, S.74). Eventuell ist an dieser Wirkung die Oxindoleinheit der Alkaloide beteiligt. Es besteht nämlich eine strukturelle Ähnlichkeit zum Antiphlogistikum Indometacin.

Das konzentrationsabhängige "Umschlagen" der Wirkung, das auch bei einigen immunstimulierenden Polysacchariden beobachtet wurde (167), ist vermutlich verantwortlich für die zunächst überraschenden Ergebnisse der CCT. Als Hypothese wäre zu diskutieren, daß an einen Träger gebundene Alkaloide von diesem in sehr kleinen Dosen, das heißt protrahiert, abgegeben werden und dadurch stimulierend wirken. In freier Form dagegen gelangen sie rasch in der applizierten Dosis an den Wirkort. Möglicherweise sind die von uns gewählten Dosen noch zu hoch für eine immunstimulierende Wirkung. Weitere Untersuchungen müßten diese Hypothese bestätigen.

Tabelle 18: Antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung des Alkaloidgemisches aus Uncaria tomentosa

a) Carragenin-Pfotenödem an Ratten

| Probe | Dosis | Applikation | % des Ödemrückganges 2.5 h | 5 h |
|---|---|---|---|---|
| Alk. | 10 ml | s.c. | 8.2 | 13.0 |
| Alk. | 30 ml | p.o. | 39.0 | 27.5 |
| Indom. | 10 mg | p.o. | 51.7 | 42.2 |

Die Testsubstanzen wurden 30 min vor der Carragenin-Injektion appliziert.

b) Adjuvans-Arthritis-Test an Ratten

| Probe | Dosis | Applikation | % des Ödemrückganges Pfote 1 | Pfote 2 |
|---|---|---|---|---|
| Alk. | 5 ml | s.c. | 42.1 | 58.7 |
| Dexam. | 0.5 mg | s.c. | 61.3 | 35.7 |
| Alk. | 10 ml | p.o. | 5.1 | 17.0 |
| Dexam. | 1 mg | p.o. | 80.7 | 57.7 |

Die Testsubstanzen wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen im Anschluß an die Adjuvans-Injektion gegeben.

Erläuterung zu beiden Testen:

Alk. = Alkaloidgemisch als Suspension in 10% Gelatine
Indom. = Indometacin mit antiphlogistischer Wirkung
Dexam. = Dexamethason mit antiphlogistischer und immunsuppressiver Wirkung

Die unterstrichenen Zahlen unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle mit $p < 0.05$ (Student's t-Test).

3. Lymphozytentransformationstest

Untersucht wurden der wässrige Gesamtextrakt aus Uncaria tomentosa, das Gesamtalkaloid und zwei weitere Fraktionen P1 und P2. P1 enthält die im Granulozytentest wirksamen Alkaloide Isopteropodin,Pteropodin, Isomitraphyllin und Isorhynchophyllin, P2 die nicht wirksamen Alkaloide Mitraphyllin und Rhynchophyllin.

Bei keiner der untersuchten Substanzen konnte weder bei der Vollblutmethode, noch bei der Messung mit isolierten Lymphozyten eine über die Spontantransformation hinausgehende Steigerung der $^{3}$H-Thymidin-Einlagerung beobachtet werden.

4. Akute Toxizität, Cytotoxizität und Antitumorwirkung

Die Prüfung auf akute Toxizität führten wir mit einem wässrigen Gesamtextrakt von Uncaria tomentosa und dem Rohalkaloidgemisch an Mäusen durch. Der Extrakt wurde mit einer Maximalkonzentration von 5 g/kg Körpergewicht peroral und mit einer Maximalkonzentration von 2 g/kg intraperitoneal appliziert. Das Alkaloidgemisch gaben wir oral bis zu 2 g/kg und intraperitoneal bis zu 1 g/kg. Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von vierzehn Tagen beobachtet und dabei keinerlei Abweichung vom normalen Verhalten festgestellt.

Die Testung auf Cytotoxizität wurde mit dem $^{3}$H-Thymidin-Einbautest an Asciteszellen durchgeführt. Untersucht wurden verschiedene Extrakte und Alkaloidanreicherungen.

Tabelle 19: Prozentuale Einbauhemmung von Extrakten und Alkaloidanreicherungen aus Uncaria tomentosa im $^{3}$H-Thymidin-Einbautest

a) Vergleich der Cytotoxizität bei einer Dosierung von 0.2%

| Probe | relative Einbauhemmung (%) |
|---|---|
| $H_2O$-Extrakt | 42 |
| $H_2O$-Extrakt der alk.Droge | 65 |
| MeOH-Extrakt | 52 |
| MeOH-Extrakt der alk.Droge | 64 |
| Gesamtalkaloidgemisch | 70 |
| P1-HCl | 100 |
| P2-HCl | 69 |

b) Prozentuale Einbauhemmung bei verschiedenen Konzentrationen

| Alkaloid-HCl | $10^{-1}$% | $10^{-2}$% | $10^{-3}$% | $10^{-4}$% | $10^{-5}$% |
|---|---|---|---|---|---|
| Gesamtalkaloid-gemisch | 67 | 36 | 38 | 12 | - |
| P1 | 93 | 86 | 45 | 15 | 15 |
| P2 | 64 | 58 | 20 | - | - |

Wie aus Tabelle 19 ersichtlich, wirken die Alkaloidanreicherungen in Konzentrationen von $10^{-1}$% cytotoxisch. Die Toxizität nimmt dann aber mit steigender Verdünnung ab.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Cytotoxizitätsuntersuchungen der Alkaloidanreicherungen P1 und P2 (s. D. 3., S.75), die am Medical Center der University of Illinois, Chicago, durchgeführt wurden. Als Testmodelle dienten KB- und P 388-Zellen (169,170). In Konzentrationen bis zu 5 µg/ml wurde das Wachstum beider Zelltypen nicht beeinflußt. Erst bei einer Dosierung von 50 µg/ml ($5 \times 10^{-3}$%) wirkten beide Proben etwas cytotoxisch (Tabelle 20, S. 77).

Tabelle 20: Cytotoxizität von P1 und P2 auf KB- und P 388-Zellen

| Alkaloidgemisch | 0.5 | | 5.0 | | 50 | | (µg/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | KB | P 388 | KB | P 388 | KB | P 388 | |
| P1-HCl | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 76 | |
| P2-HCl | 100 | 100 | 100 | 100 | 77 | 64 | |

angegeben ist die prozentuale Überlebensrate der Zellen

Beide Cytotoxizitätsteste bestätigen die bereits beim Emetin gemachte Beobachtung (Kapitel 3, 4., S. 33) der Korrelation zwischen Cytotoxizität und Immunstimulation. So lysiert z.B. das Gesamtalkaloidgemisch in einer Konzentration von $10^{-1}$% die Granulozyten. In weiteren Verdünnungen, die nicht oder kaum mehr cytotoxisch wirken, können wir Immunstimulation beobachten. Interessanterweise ist das Gemisch P2 mit den im Granulozytentest nicht wirksamen Alkaloiden Mitraphyllin und Rhynchophyllin im $^{3}$H-Thymidin-Einbautest weniger toxisch als das Gemisch P2 mit den wirksamen Alkaloiden.

Nach den Regeln des National Cancer Institut (NCI) kommen Substanzen nicht als potentielle Antitumortherapeutika in Frage, wenn die Dosis, die zur Hemmung des Zellwachstums benötigt wird, $>$ 5 µg/ml ist.

Untersuchungen am NCI in Maryland, USA, mit einem nach der Vorschrift des NCI hergestelltem ethanolischen Extrakt aus der Wurzel von Uncaria tomentosa und dem Alkaloidgemisch bestätigten dies. Weder in einer in-vivo-Versuchsreihe an weiblichen Mäusen mit P 388-Lymphozyten-Leukämie noch bei in-vitro-Versuchen an Zellkulturen eines menschlichen Nasopharynx-Epidermis-Carcinoms (KB-System) wurde in den testüblichen Konzentrationen das Zellwachstum gehemmt.

## 5. Zusammenfassung und Diskussion der immunologischen Untersuchungen

Die immunologischen Untersuchungen sprechen dafür, daß die Alkaloidfraktion aus Uncaria tomentosa das Hauptwirkprinzip der Droge darstellt. Die Wirksamkeit ist durch eine gesteigerte Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten und durch eine Stimulation des RES bestimmt. Dabei kommt besonders bei den in-vivo-Untersuchungen den natürlich vorliegenden bzw. nachträglich zugesetzten Begleitstoffen eine wichtige Adjuvans-Rolle zu. Inwieweit diese Begleitstoffe den niedermolekularen Verbindungen nur als Trägermaterialien dienen, oder ob sie ebenfalls am eigentlichen immunologischen Geschehen teilhaben, ist nach den bisherigen Kenntnissen noch offen.

Eine in-vitro-Induktion der Blastentransformation normaler Lymphozyten wurde weder mit dem wässrigen Gesamtextrakt der Droge noch mit dem Alkaloidgemisch erreicht.

KEPLINGER (115) konnte in vivo nach Gabe eines wässrigen Gesamtextraktes eine Zunahme der Leukozytenzahl bei unter Chemotherapie stehenden krebskranken Menschen beobachten, was allerdings zu unseren Ergebnissen keinen Widerspruch darstellt.

# KAPITEL 5:

# Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Okoubaka aubrevillei PELLEG. u. NORMAND.

## A. Allgemeine Übersicht

### 1. Volksmedizinische Anwendung der Droge

Okoubaka aubrevillei wird in der Volksmedizin Ghanas und der Elfenbeinküste als Medikament gegen Lepra und Syphilis angewendet. Die Eingeborenen stellen aus der Rinde ein wässriges Mazerat her und waschen sich damit zum Schutz vor diesen Krankheiten (171). Daneben wird die gestoßene Baumrinde innerlich als Vorbeugungs- und Behandlungsmittel gegen jegliche Art von Vergiftung genommen (172).

In Europa finden ethanolische Auszüge der Stammrinde und homöopathische Verdünnungen bis D5 bei verschiedenen alimentären Intoxikationen Verwendung. Außerdem liegen Berichte vor, nach denen Restbeschwerden verschiedener Infektionskrankheiten durch Einnahme von Okoubaka ausgeheilt werden konnten. Zusätzlich wird Okoubaka mit Erfolg als Vorbeugemittel gegen Gastroenteritiden verabreicht (172).

Wie bei Uncaria tomentosa deuten auch bei dieser Droge alle Indikationen, vor allem aber die homöopathische Anwendungsform, auf einen immunologischen Wirkmechanismus hin.

### 2. Botanik

#### 2.1. Systematik

Okoubaka aubrevillei wird zu der nur sieben Arten umfassenden Familie der Octoknemaceae gezählt. Alle Arten sind in Afrika beheimatet (173). Zusammen mit den Olacaceae werden sie den Santalales (174) oder den Olacales (175) zugeordnet.

Die von TIEGHEM (173) vorgenommene Abtrennung der Octoknemaceae von den Olacaceaen wurde nicht von allen Autoren anerkannt.
WETTSTEIN (176) vereinigte beide Familien wieder zu den Olacaceae. Eine eindeutige Klärung der Familien- und Ordnungszugehörigkeit konnte bis heute nicht erreicht werden, da fast keine chemotaxonomischen Untersuchungen beider Familien vorliegen. Lediglich CHENERY (177) berichtet über eine Aluminiumakkumulation in den Octoknemaceae, welche in den Olacaceae nicht zu beobachten ist.

## 2.2. Vorkommen und Beschreibung der Pflanze

Okoubaka aubrevillei ist ein großer Baum mit ausladender Krone, eine Höhe von 25 - 30 m und einem Stammumfang bis zu 3 m.
Die ungeteilten Blätter sind eiförmig länglich, 15 - 20 x 10 - 20 cm groß und vorne leicht spitz zulaufend. Die kleinen grünlichen eingeschlechtlichen Blüten mit einfacher fünfzähliger Blütenhülle sitzen auf bis zu 15 cm langer Stacheln auf älteren Zweigen. Die männlichen Blüten haben fünf Staubblätter, die weiblichen Blüten besitzen einen unterständigen, einfächrigen Fruchtknoten mit drei Samenanlagen. Die Früchte sind einsamige Nüsse, der Samen zeichnet sich durch stärke- und ölreiches Endosperm aus.
Wir finden den Baum vereinzelt in den Wäldern der Elfenbeinküste, Ghanas und Nigerias. Auffällig ist dabei, daß niemals weitere Bäume in seiner näheren Umgebung wachsen, und daß auch das ihn umgebende Unterholz sich von dem der übrigen Bäume unterscheidet (171,172,173).

Eine Habituszeichnung oder eine Standortaufnahme ließ sich in der uns zugänglichen Literatur nicht finden.

Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen der Rindendroge fehlen.

## 2.3. Pharmakognostische Untersuchung der Stammrinde

Die uns zur Verfügung stehende Droge bestand makroskopisch aus älteren etwa 0.5 bis 1 cm dicken Stammrindenstücken. Während die hellbraune, an einigen Stellen rostbraun eingesprenkelte Außenrinde eine schwach wellige Struktur aufwies, war die ockerbraune Innenseite relativ glatt und dicht mit Bastfasern durchzogen, wodurch eine Maserung in Längsrichtung gut erkennbar wurde. Die sehr harte Rinde zeigte einen staubigen, aber nicht faserigen Bruch.

Mikroskopisch sind nach außen hin polygonale bräunlich gefärbte Korkzellschichten und vereinzelt Lentizellen zu erkennen. Die darunterliegenden Zellschichten weisen vorwiegend isodiametrische, teilweise bräunlich gefärbte

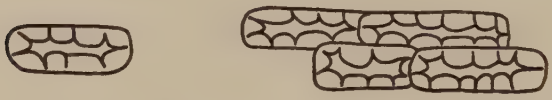
parenchymatische Zellen auf. Daneben fallen vor allem in der primären Rinde größere Steinzellnester auf. Die einzelnen gelblich gefärbten Zellen sind stark getüpfelt, haben ein kleines Lumen und sind etwas in radialer Richtung gestreckt. In der sekundären Rinde kommen die Steinzellnester seltener vor. Die sekundären Markstrahlen sind 2 - 4 Zellreihen breit und 10 - 12 Zellschichten hoch, die primären Markstrahlen sind mit einer Breite von etwa 5 Zellen und einer Höhe von 15 Zellen etwas größer. Alle Markstrahlzellen sind langgestreckt und braun-beige pigmentiert. Zwischen den Markstrahlen finden wir locker geschichtete Bastparenchymzellen, die strickleiterartig angeordnet sind. In der inneren Rinde erkennen wir deutlich Bastfaserbündel, die von Kristallzellreihen umgeben sind. Jede Kristallzelle enthält je ein Calciumoxalatkristall. Auch hier finden sich isodiametrische Parenchymzellen mit braunem Inhalt.

Die Braunfärbung der verschiedenen parenchymatischen Zellen ist auf Gerbstoffe zurückzuführen, welche zum Teil in Glycerin löslich sind.

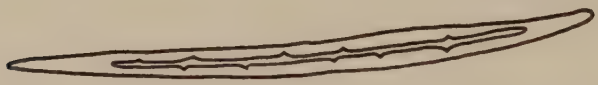
Im Pulver fallen die sehr zahlreich vorhandenen großen Steinzellnester auf, die sich zum Teil durch eine langgestreckte Form auszeichnen. Neben einzelnen Steinzellen finden wir außerdem viele vier- und sechseckige Prismen, die im polarisierten Licht hell aufleuchten. Weniger typisch sind die in fast allen Rindendrogen vorkommenden braunen Korkzellen, die langgestreckten Bastfasern mit kleinem Lumen und braun gefärbte Parenchymzellen. Stärke fehlt.

Die typischen Pulvermerkmale der Rinde von Okoubaka aubrevillei sind in Abbildung 14, S. 82, wiedergegeben.

einzelne Steinzellen und Steinzellnester



einzelne Steinzellen und Steinzellnester, langgestreckt



lange, schmale Bastfasern mit engem Lumen

brauner Kork
(Ansicht schräg von oben)

einzelne Prismen

Abb. 14

Pulvermerkmale der Rinde von Okoubaka aubrevillei
(Vergrößerung 10 x 40)

## B. Phytochemische Untersuchungen

### 1. Untersuchung des Inhaltsstoffmusters

Wir unterteilten die Drogeninhaltsstoffe durch Extraktion mit n-Hexan und Ether bzw. mit Methanol und Wasser in eine Lipidfraktion und eine hydrophile Fraktion.

Der Nachweis von Sterinen und Lipiden in der Lipidfraktion wurde durch Kieselgel-DC im LM VII geführt. Dabei befanden sich im oberen $R_f$-Bereich im UV 366 nm grünblau fluoreszierende Zonen, die von verschiedenen Lipiden stammen könnten. Die Sterine wurden mit Liebermann-Burchard- (178), Anisaldehyd-Schwefelsäure- (179) und Komarowsky-Reagens (180) detektiert.

Der methanolische Gesamtextrakt wurde im Fließmittel nach BITTNER (181) chromatographiert. Der Test auf Flavonoide, Cumarine und Phenolcarbonsäuren durch Besprühen mit methanolischer KOH (181) bzw. mit Naturstoffreagens nach NEU (182) verliefen negativ. Mit diazotierter Sulfanilsäure nach PAULY (183) waren dagegen über den gesamten $R_f$-Bereich verteilte rote Zonen nachzuweisen.

a) Prüfung auf Gerbstoffe

Die dunkelbraune Färbung des methanolischen Gesamtextraktes der Rindendroge, stark positive Gelatine- bzw. Bleiacetatfällungen, sowie eine schwarzgrüne Färbung nach Zugabe von Eisen-III-chlorid (184) sprachen für das Vorliegen von Gerbstoffen. Die Formaldehyd-Salzsäure-Probe (185) wies auf das Vorliegen eines Gemisches aus Gallotanninen und Catechinen hin.

b) Prüfung auf biogene Amine und Aminosäuren

Wir gaben den eingeengten Methanol-Wasser-Extrakt über eine Amberlite IR-120-Säule und erhielten durch Elution mit 1n $NH_3$ die Aminosäurefraktion.
Das Vorliegen von Aminosäuren wurde durch eine positive Reaktion mit Ninhydrin-Reagens (186) nach Entwicklung in LM IV bewiesen.

Nach einem von GREVEL (187) ausgearbeiteten Verfahren ließen sich in dem Okoubakaextrakt Spuren von "amphoteren" Aminen nachweisen.

c) Prüfung auf Alkaloide

Neben den bisher untersuchten Extrakten wurden nach Vorbehandlung der Droge mit 10%iger $Na_2CO_3$-Lösung nacheinander n-Hexan-, Ether- und Methanol-Extrakte hergestellt.

Mit den Fällungsreagentien von VALSER (129) und MEYER (185) entstanden bei allen untersuchten Extrakten nur schwache Trübungen. Lediglich der basische Methanolextrakt ergab eine deutliche Ausfällung, die aber unter dem Standard einer 0.01%igen Strychninlösung lag.

Chromatographie in verschieden polaren Laufmitteln ergab nach Detektion mit Dragendorff-Reagens nach MUNIER und MACHEBOEUFF (131) sowohl beim basischen und nicht basischen n-Hexan-Auszug als auch beim basischen Methanolauszug eine positive Reaktion.

In späteren Versuchen wurde nachgewiesen, daß es sich bei den im n-Hexan-Auszug detektierten Substanzen um Sterine, handelte. Dieser Befund deckt sich mit Beobachtungen von FARNSWORTH (188,189) und ANDERSON (190), die feststellten, daß eine Reihe nicht stickstoffhaltiger Substanzklassen ebenfalls eine Dragendorff-Reaktion geben. Charakteristisch für solche Verbindungen ist eine konjugierte Carbonylfunktion als Strukturelement. Nach ANDERSON liefern auch eine Reihe von Steroiden und Triterpenen diese Reaktion.

In verschiedenen Chromatogrammen des Methanolauszuges ließ sich jeweils am Start ein intensiver Dragendorff-positiver Fleck detektieren. Wir prüften daher nach einer Vorschrift von BRÜNING (191) durch Zugabe einiger Tropfen einer wässrigen gesättigten Ammonium-Reineckatlösung auf quartere Alkaloide, allerdings mit negativem Resultat.

Der Nachweis von evtl. vorhandenen sehr polaren N-Oxiden nach dem von HUIZING (133) ausgearbeiteten Verfahren verlief ebenfalls negativ.

Negative Ergebnisse erhielten wir auch bei der Prüfung auf wasserdampfflüchtige Substanzen bzw. etherische Öle, Iridoide, Bitterstoffe, Saponine, Anthrachinonderivate, Herzglykoside und Proanthocyanidine (Leukoanthocyanidine).

## 2. Nähere Charakterisierung einiger Inhaltsstoffe

Zur näheren Charakterisierung der durch DC nachgewiesenen Inhaltsstoffe wählten wir den in Abbildung 15, S. 86, gezeigten Extraktionsgang.

### 2.1. "Alkaloide"

#### 2.1.1. Gewinnung und DC-Untersuchung eines "Rohalkaloidgemisches"

Aus 1 kg eingesetztem Drogenpulver erhielten wir 80 mg "Rohalkaloidgemisch", entsprechend einer Ausbeute von nur 0.008%.

Nach DC in LM I ergab das Alkaloidgemisch bei UV-Betrachtung bzw. Besprühen mit Dragendorff-Reagens das in Abbildung 16, S. 87, wiedergegebene Chromatogrammbild.

Zur Detektion der Alkaloide erwies sich Dragendorffs Reagens am geeignetsten. Mit Kaliumjodplatinat (192) besprüht zeigten die Dragendorff-positiven Substanzen eine hellbraune Farbe. Keine Reaktion erhielten wir beim Besprühen mit Eisen-III-chlorid, Antimon-III-chlorid (193) und VAN URK's-Reagens (194). Damit konnten wir das Vorliegen von phenolischen Gruppierungen, von Steroid- und Indolderivaten ausschließen. Die Abwesenheit von Glykosiden wurde durch das Ausbleiben einer positiven Zuckerreaktion mit Diphenylaminophosphorsäure (195) nach Hydrolyse festgestellt.

Extraktionsgang der Rindendroge von Okoubaka aubrevillei

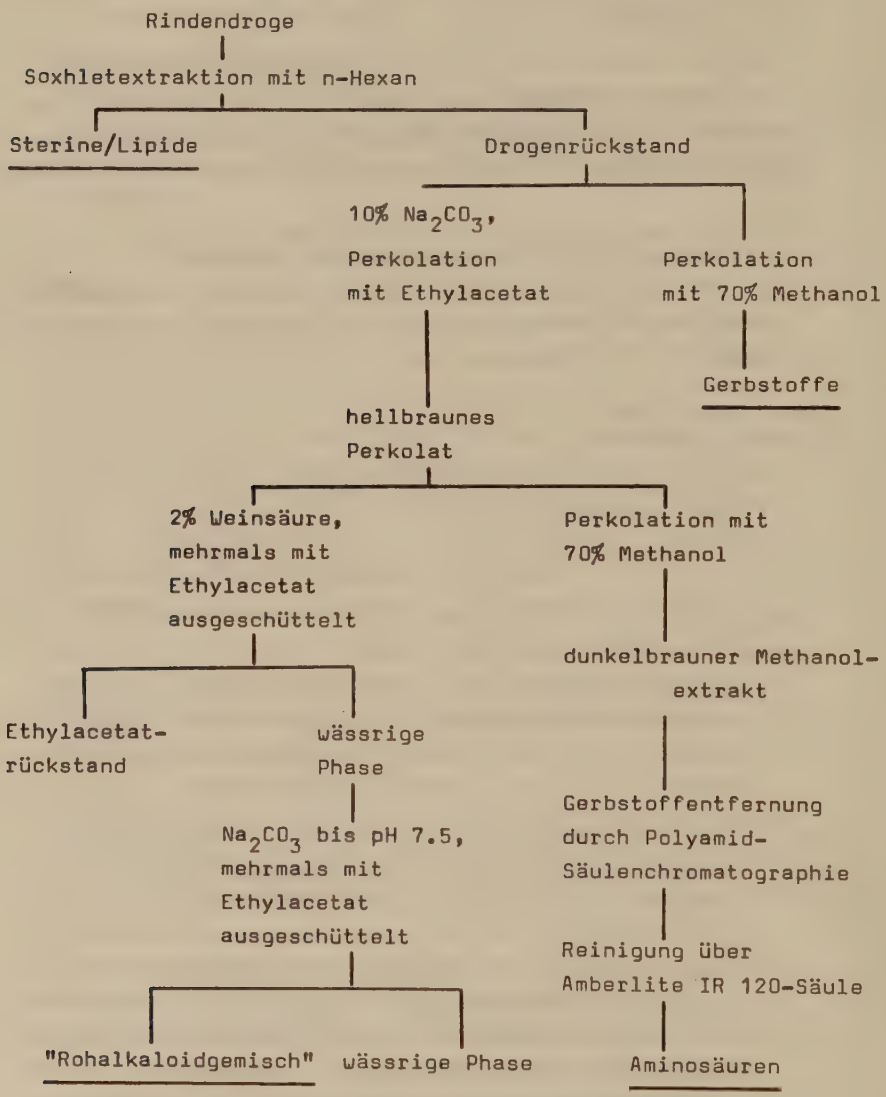
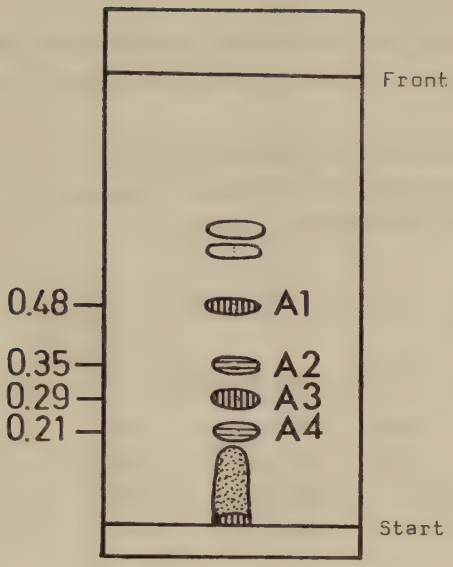



Abb. 15




LM I

Detektion: = $UV_{254}$ Fluoreszenzlöschung

= Dragendorff stark positiv + $UV_{254}$ pos.

= Dragendorff schwach positiv + $UV_{254}$ pos.

= braun im vis, Farbintensivierung nach Besprühen mit Dragendorff

Abb. 16

Dünnschichtchromatogramm des "Rohalkaloidgemisches"

### 2.1.2. Präparative Auftrennung des "Alkaloidgemisches" durch Schichtchromatographie

Zur Auftrennung des "Rohalkaloidgemisches" wählten wir die präparative Schichtchromatographie auf Kieselgelfertigplatten.

Die vier isolierten Verbindungen erwiesen sich bei der chromatographischen Überprüfung in mehreren Fließmittelsystemen auf verschiedenen Trägermaterialien als einheitlich.

Wir erhielten alle vier Substanzen als gelbe ölige Flüssigkeiten.

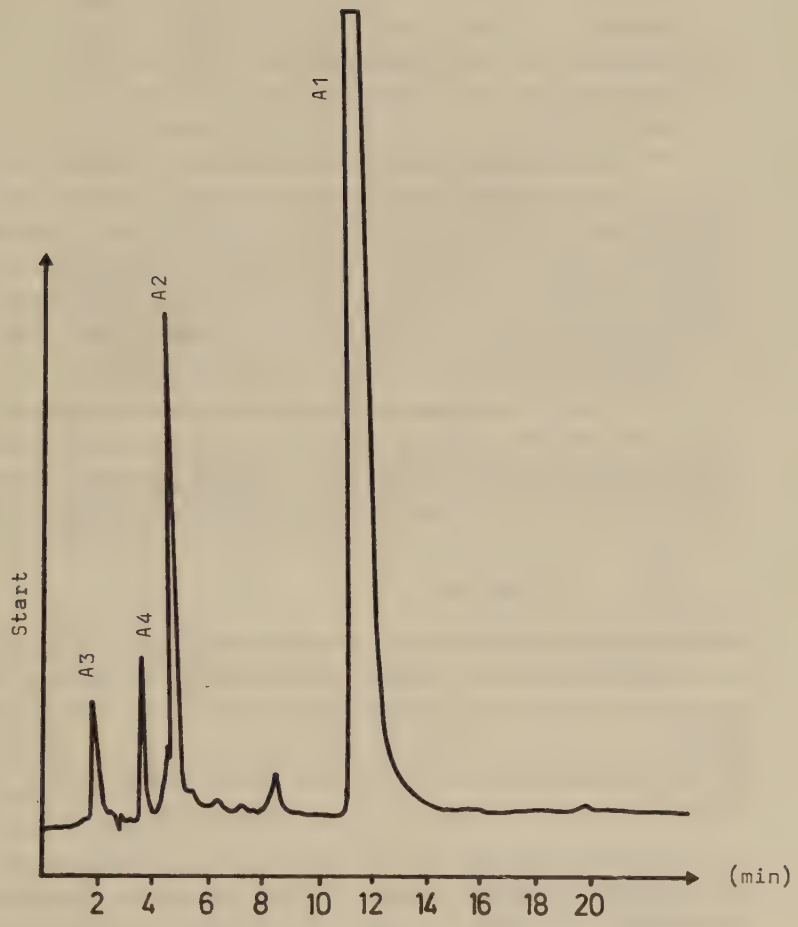
Die Ausbeuten aus 60 mg eingesetztem Rohextrakt betrugen

| | | |
|---|---|---|
| A1 = | 5.5 mg | = 9.2% |
| A2 = | 2.9 mg | = 4.8% |
| A3 = | 7.5 mg | = 12.5% |
| A4 = | 4.0 mg | = 6.7% |

### 2.1.3. Reinigung der isolierten "Alkaloide" durch präparative HPLC

Nach den orientierend aufgenommenen Massenspektren waren die Verbindungen nicht rein. Wir versuchten sie daher durch HPLC mit präparativem Umkehrsystem zu reinigen.

Mit einem Modellgemisch aus gleichen Teilen A1, A2, A3 und A4 wurden die optimalen Trennbedingungen auf einer semipräparativen µ-Bondapck $C_{18}$-Säule ermittelt. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm, nachdem die $\lambda_{max}$-Werte der Verbindungen in Methanol mit A1 = 256 nm, A2 = 254 nm, A3 = 229 nm und A4 = 234 nm ermittelt wurden (Abb. 17, S. 89).




Geräte- und Trennparameter: siehe Exp.Teil III. 1.4., S. 130

Abb. 17
HPLC-Trennung eines Modellgemisches aus A1 - A4

Wir erhielten:

A1: amorph, 2.2 mg, Smp. 225° - 228°C
A2: amorph, 1.4 mg, Smp. 179° - 184°C
A3: amorph, 3.3 mg, Smp. 123° - 128°C
A4: amorph, 2.0 mg, Smp. 165° - 167°C

Obwohl alle vier Substanzen die gleichen $R_f$-Werte wie die Ausgangsverbindungen zeigten, ließen sie sich jetzt nicht mehr mit Dragendorff-Reagens detektieren. Lediglich nach Besprühen mit konzentrierter Schwefelsäure und 10minütigem Erhitzen auf 110°C wurden die Verbindungen als dunkle Flecken auf der Platte sichtbar. Damit war das Vorliegen von Alkaloiden nahezu ausgeschlossen.

Da weder das Substanzgemisch, noch die durch präparative Schichtchromatographie und HPLC gereinigten Verbindungen im Granulozytentest eine Wirkung zeigten, wurden zunächst keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

## 2.2. Aminosäuren und Peptide

Die Aminosäure-Peptid-Fraktion wurde nach dem in Abb. 15, S. 86, wiedergegebenen Schema gewonnen. Die DC-Untersuchung erfolgte mit Hilfe von Vergleichssubstanzen in LM III und IV.
Als freie Aminosäure dominiert das Phenylalanin neben Tyrosin, in Spuren konnten wir Lysin nachweisen.

Zur Untersuchung auf Peptide unterwarfen wir einen Teil der Aminosäure-Peptid-Fraktion einer nach MOORE (196) modifizierten Hydrolyse. In dem so erhaltenen komplexen Aminosäuregemisch ließen sich nach zweidimensionaler Trennung neben Phenylalanin und Lysin auch geringe Mengen von Glycin, Glutaminsäure, Alanin, Threonin und Leucin/Isoleucin detektieren. Tyrosin war nicht mehr nachweisbar, da es sich unter stark sauren Bedingungen leicht zersetzt. Es kann daher mit in geringer Konzentration vorliegenden Peptiden gerechnet werden.

## 2.3. Gerbstoffe

### 2.3.1. Catechine

Während wir in dem durch Soxhletextraktion erhaltenen Extrakt keine Gerbstoffvorstufen finden konnten, ließen sich Catechine in einem durch fünfstündige Methanolmazeration hergestellten Extrakt nachweisen.

Zur näheren Untersuchung dieser Verbindungen entwickelten wir die durch Ethylacetatausschüttelung und Säulenchromatographie angereicherte Catechin-Fraktion in einem von VUATAZ (197) für Catechintrennungen vorgeschlagenen Fließmittel (LM V). Nach Besprühen mit Vanillin-Salzsäure (198) und p-Toluolsulfonsäure (199) ließen sich sechs Catechinverbindungen detektieren.

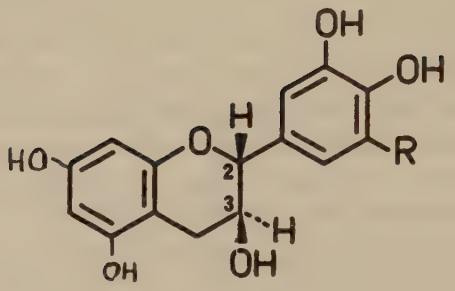
Durch Isolierung mittels präparativer DC konnten alle sechs Verbindungen mit Hilfe von Testsubstanzen bzw. durch $R_f$- und Schmelzpunktvergleiche mit Literaturangaben identifiziert werden (Tab. 21 und Abb. 18, S. 92).

Tabelle 21: Charakterisierung der Catechine aus Okoubaka aubrevillei

| Substanz | $R_f$ in LM V | Smp. (°C) |
|---|---|---|
| (+)Catechin | 0.73 | 94 - 99 |
| (+)Gallocatechin | 0.55 | - |
| (-)Epicatechin | 0.62 | 238 - 243 |
| (-)Epigallocatechin | 0.44 | 210 - 212 |
| (-)Epicatechingallat | 0.83 | 248 - 252 |
| (-)Epigallocatechingallat | 0.68 | 209 - 211 |

Die vier nachgewiesenen Catechine mit (+)Catechin als Hauptsubstanz sind ubiquitär in gerbstoffhaltigen Drogen zu finden. Auch die beiden in geringerer Konzentration vorliegenden Gallussäureester der Catechine kommen häufiger in der Natur vor (200).

1.

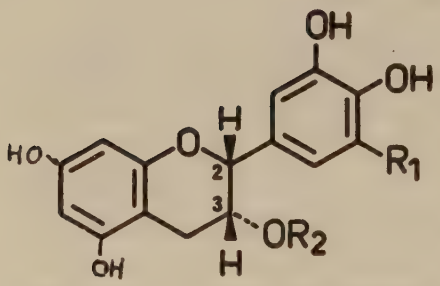



2,3 trans

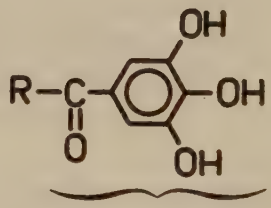
R = H : (+)-Catechin

R = OH: (+)-Gallocatechin

2.




2,3 cis




Galloylrest

$R_1$, $R_2$ = H: (-)-Epicatechin

$R_1$ = OH, $R_2$ = H: (-)-Epigallocatechin

$R_1$ = H, $R_2$ = Galloylrest: (-)-Epicatechingallat

$R_1$ = OH, $R_2$ = Galloylrest: (-)-Epigallocatechingallat

Abb. 18

Catechine aus Okoubaka aubrevillei

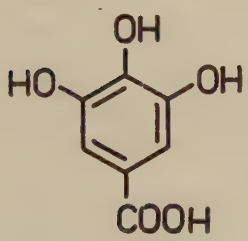
## 2.3.2. Tannine

Zur Ermittlung der Tanninzusammensetzung hydrolysierten wir das Okoubakatannin und chromatographierten das Hydrolysat in LM VI.

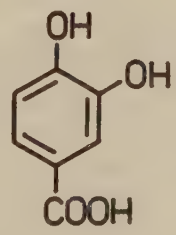
Neben geringen Mengen (+)Catechin und (-)Epicatechin und weiteren nicht identifizierbaren Substanzen fielen zwei im UV-Licht intensiv blau fluoreszierende Flecken im $R_f$-Bereich von ca. 0.70 und 0.35 auf. Sie wurden durch präparative Schichtchromatographie isoliert und konnten beide in Form langer weißer Nadeln aus Wasser kristallisiert werden.

Durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt wurden die Substanzen als Protocatechusäure und Gallussäure identifiziert, wobei Gallussäure die Hauptsubstanz darstellt(Abb.19).

Als Zuckerbaustein war nur Glucose nachweisbar.
Auch diese Analyse zeigte keine Besonderheiten gegenüber bisher bekannten Gerbstoffdrogen.




Gallussäure




Protocatechusäure

Abb. 19

Monomere Bausteine des Okoubaka-Tannins

## 2.4. Sterine, Sterinester und Lipide

### 2.4.1. Sterine

Die im n-Hexan-Auszug enthaltenen Sterine wurden im LM VIII chromatographiert und mit Anisaldehyd-Schwefelsäure detektiert. Als Vergleichssubstanz diente β-Sitosterin. Von den sieben getrennten Substanzen des Extraktes ließ sich die Hauptzone im $R_f$-Bereich von 0.5 dem β-Sitosterin zuordnen.

Zur genaueren Identifizierung isolierten wir diese Zone durch präparative Schichtchromatographie. Das Auftreten zweier Massenpeaks bei $M^+$ 414 und $M^+$ 412 zeigte ein Gemisch von zwei Substanzen an. Durch Schichtchromatographie auf HPTLC-Platten ließen sich zwei in ungefähr gleichen Mengenverhältnissen vorliegende Substanzen trennen, die leicht aus absolutem Ethanol zu kristallisieren waren.

Durch Mischschmelzpunkt und Überlagerungs-IR-Spektrum konnten wir diese Verbindungen identifizieren als

Stigmasterin: Smp. 168° - 170°C, $M^+$ 414 (m/e) und
β-Sitosterin: Smp. 139° - 140°C, $M^+$ 412 (m/e).

### 2.4.2. Sterinester und Lipide

Die Sterinester und Lipide des n-Hexan-Auszuges reicherten wir durch Säulenchromatographie mit einer Petrolether-Ether-Gradienten-Elution an.
Im Laufmittel modifiziert nach GLASL (201) (LM X) können diese Stoffgruppen auf Kieselgelplatten voneinander getrennt werden. Die Detektion der Lipide erfolgt mit Rhodamin 6-G-Lösung (201), die Sterinacetate werden mit Anisaldehyd-Schwefelsäure sichtbar gemacht.
In unserem Gemisch ließ sich anhand von Vergleichssubstanzen neben in geringer Menge vorkommenden Tri- und Diglyceriden ein intensiver Sterinfleck im $R_f$-Bereich von 0.75 detektieren. Nach dem MS sollte ein Acetatgemisch von β-Sitosterin und Stigmasterin vorliegen.

## C. Pharmakologische Untersuchungen

### 1. Akute Toxizität

Wir führten mit einem wässrig-methanolischen Gesamtextrakt der Stammrinde einen über 14 Tage dauernden Toxizitätstest an Mäusen durch. Ein Kollektiv von jeweils fünf Mäusen bekam zwischen 600 mg und 6 g/kg Extrakt peroral mittels einer Schlundsonde appliziert. Daneben wurde einem weiteren Kollektiv 20 mg/kg das "Rohalkaloidgemisch" peroral gegeben.

Da wir bei beiden Testgemischen keinerlei Abweichungen vom normalen Verhalten innerhalb des Versuchszeitraums feststellen konnten, dürfte die Namensgebung durch die Eingeborenen "Baum des Todes" für Okoubaka aubrevillei andere Gründe haben.

### 2. Mikrobiologische Untersuchungen

Untersucht wurden das wässrige Mazerat der Droge, die"Alkaloidgesamtfraktion" und als Vergleich ein Modellgemisch aus gleichen Teilen kondensierten und hydrolysierbaren Gerbstoffen.
Unter den verschiedenen Möglichkeiten zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration wählten wir den Agardilutionstest. Dabei wurden die gelösten Testextrakte dem erwärmten, flüssigen Nährmedium so zupipettiert, daß als gewünschte Endkonzentration in den Petrischalen eine geometrische Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 0.25-1-4-16-64-256-1024 µg/ml erreicht wurde. Anschließend beimpften wir die Platten mit insgesamt 66 verschiedenen Bakterienstämmen.

Nach 16stündiger Bebrütung bei 37°C wurde die niedrigste Konzentration, welche zur vollständigen Hemmung der aufgebrachten Bakterien führte (MHK), ermittelt.

Das wässrige Mazerat der Gesamtdroge zeigte bis zur höchsten eingesetzten Konzentration keine Hemmwirkung auf die getesteten Stämme. Das "Alkaloidgemisch" wirkte differenziert auf grampositive und gramnegative Bakterien. Während die MHK bei gramnegativen Bakterien erst bei einer Konzentration von 1024 µg/ml erreicht wurde, erhielten wir bei der überwiegenden Zahl der grampositiven Bakterien eine Wachstumshemmung bereits bei einer Konzentration von 256 µg/ml. Zu den grampositiven Bakterien gehören unter anderem die von uns getesteten verschiedenen Staphylokokken- und Streptokokkenarten, die häufig Ursache für lokale Eiterungen sind (202). Das Modellgemisch aus kondensierten und hydrolysierbaren Gerbstoffen wirkte undifferenziert bei Konzentrationen zwischen 256 µg/ml und 1024 µg/ml auf das Wachstum der grampositiven und gramnegativen Bakterien ein. Hier machen sich bereits die eiweißfällenden Eigenschaften von Gerbstoffen bemerkbar, die in höheren Konzentrationen immer bakteriostatisch wirken (203).

Nach diesen Untersuchungen ist eine antibiotisch wirksame Substanz in Okoubaka nicht vorhanden, da ein Chemotherapeutikum in diesen Testen bereits bei Konzentrationen um 1 µg/ml das Wachstum sensitiver Bakterienstämme hemmen würde.

Die günstigen Effekte des lokal angewendeten wässrigen Drogenextraktes bei Hautinfektionen könnten durch die vorliegenden phenolischen Verbindungen erklärt werden.

### 3. Leberschutzwirkung im Hepatozytentest

Die volksmedizinische Anwendung der Okoubakarinde als Vorbeugungs- und Behandlungsmittel gegen jegliche Art von Vergiftung könnte auf einer antihepatotoxischen Wirkung beruhen.
Zur Überprüfung dieser Hypothese verwendeten wir ein von HIKINO (204,205) ausgearbeitetes in-vitro-Testsystem auf Leberschutzwirkung, da dieses Modell die Anwendung von

Okoubakarinde bei alimentären Intoxikationen relativ gut simuliert und nach FIEBIG (206) dieser Hepatozytentest als Screeningmethode für eine Leberschutzwirkung geeignet ist.

Das Prinzip dieses Testes beruht auf einer Schädigung isolierter Rattenhepatozyten durch $CCl_4$ oder Galaktosamin, wodurch das Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) freigesetzt wird, welches dann per Autoanalyser bestimmt werden kann.

Ist eine Testsubstanz hepatoprotektiv, so wird die GPT-Freisetzung mehr oder weniger stark gehemmt.

Zur Testung wurde ein Extrakt aus den vereinigten Ethylacetat-, Methanol- und Wasserextrakten der Droge durch mehrmalige Polyamidsäulenfiltration von einem Teil der als leberschädigend bekannten Gerbstoffe befreit. In der für Extrakte üblichen Dosierung von 1 mg/ml wurde weder die durch $CCl_4$ noch durch Galactosamin induzierte GPT-Freisetzung signifikant gehemmt. Damit ist eine Leberwirksamkeit des Okoubakaextraktes wenig wahrscheinlich.

## 4. Immunologische Untersuchungen

Während die lipophilen n-Butanol-, Chloroform- und n-Hexan-Auszüge in Dimethylsulfoxid gelöst im Granulozyten-Test keine Aktivitätssteigerung gegenüber dem DMSO-Blindwert zeigten, erhielten wir mit einem wässrigen und einem ethanolischen Mazerat der Droge Steigerungsraten über 20% und damit eine deutliche Stimulierung der Granulozyten. Auch die im Handel erhältliche Okoubaka-Urtinktur (DHU) erwies sich im Granulozytentest als wirksam.

Damit hatten wir einen ersten Hinweis auf eine immunologische Wirksamkeit der Droge. Wir konzentrierten daher die Untersuchungen auf die hydrophilen Extrakte und Einzelsubstanzen, die aus Okoubaka aubrevillei erhalten wurden.

Die Ergebnisse der Testungen können den Tabelle 22 und 23, S. 98, entnommen werden.

Tabelle 22: Prozentuale Phagozytosesteigerung verschiedener Fraktionen aus Okoubakarinde

| | $10^{-1}$% | $10^{-2}$% | $10^{-3}$% | $10^{-4}$% |
|---|---|---|---|---|
| Okoubaka-Urtinktur (DHU) | 15.2 | 22.8 | 23.0 | 11.7 |
| $H_2O$-Mazerat | - | 28.4 | 27.6 | 11.5 |
| EtOH-Mazerat | 20.1 | 23.7 | 22.1 | 14.8 |
| Aminosäure-Peptid-Gemisch | - | 26.1 | 36.0 | - |
| Gerbstoffgemisch durch Polyamid-SC gewonnen | 16.0 | 11.6 | 15.6 | - |
| hochmolekulare Gerbstoffe | - | 13.4 | - | - |
| "Rohalkaloid" | - | 13.5 | 13.5 | - |

Tabelle 23: Prozentuale Phagozytosesteigerung verschiedener hydrophiler Reinsubstanzen aus Okoubakarinde

| | $10^{-1}$% | $10^{-2}$% | $10^{-3}$% | $10^{-4}$% |
|---|---|---|---|---|
| A1 | - | 21.0 | 17.2 | 11.7 |
| A2 | - | - | - | - |
| A3 | - | - | 15.7 | - |
| A4 | - | - | 5.5 | - |
| (+)-Catechin | - | 14.1 | - | 5.2 |
| (-)-Epicatechin | - | - | - | - |
| (+)-Gallocatechin | - | 11.2 | - | - |
| (-)-Epigallocatechin | 7.9 | 9.8 | - | - |
| (-)-Epicatechingallat | 22.7 | 8.8 | 25.0 | - |
| (-)-Epigallocatechingallat | 26.5 | 24.1 | - | - |
| Gallussäure | - | 26.7 | 37.0 | 31.5 |
| Protocatechusäure | - | 37.5 | 48.6 | 29.2 |

Die Substanzen A1 - A4 waren nicht oder nur sehr schwach wirksam. Bei den niedermolekularen Catechinbausteinen zeigten die Gallussäureester von Epicatechin und Epigallocatechin eine Aktivitätssteigerung der Granulozyten.

Während die Testungen der höhermolekularen Gerbstoffe sowohl vom Catechin- als auch vom Tannintyp negative Ergebnisse brachten, wiesen die monomeren Bausteine der Okoubakatannine, Gallussäure und Protocatechusäure, eine reproduzierbar hohe Aktivitätssteigerung auf. Obwohl sich weder Gallussäure noch Protocatechusäure in freier Form im Ethanolextrakt nachweisen lassen, könnten sie an der immunologischen Wirksamkeit der Droge beteiligt sein. Bei oraler Anwendung wird das Tannin bereits im oberen Dünndarm gespalten und die monomeren Bausteine, wie z.B. Gallussäure, teilweise resorbiert. Nach MÖLLER (203) läßt sich bei peroraler Gabe Tannin in den Faeces niemals unverändert nachweisen. Im Harn findet man Gallussäure.

Alle wirksamen Reinsubstanzen im Gerbstoffanteil der Okoubakarinde besitzen Hydroxy- und Carboxyl-Gruppen. Wie im Kapitel 1, S. 10, dargestellt, sind bereits andere Phenolcarbonsäuren auf immunstimulierende Eigenschaften untersucht worden. So wiesen BOXER (43) für die 2,3-Dihydroxybenzoesäure und XU (44) für die Ferulasäure phagozytosesteigernde Wirkungen nach. Inwieweit sich dieses gemeinsame Strukturmerkmal auch auf die immunstimulierende Wirkung von "sauren Polysacchariden" übertragen läßt, wäre Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Auch die starke phagozytosesteigernde Wirkung des Aminosäure-Peptid-Gemisches deckt sich mit Beobachtungen vor allem japanischer Autoren, die für eine größere Anzahl von Aminosäurederivaten immunstimulierende Eigenschaften nachweisen konnten. Eine Übersicht über den Stand der Arbeiten gibt UMEZAWA (46). Diese Aminosäurederivate kommen allerdings nicht in höheren Pflanzen vor, sondern werden aus Bakterienzellkulturen gewonnen. Ebenso zeigen einige natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Peptide phagozytosestimulierende Eigenschaften (207,208).

## D. Zusammenfassung und Diskussion der in Kapitel 5 erhaltenen Ergebnisse

Bei der Rinde von Okoubaka aubrevillei handelt es sich um eine Gerbstoffdroge, die ein Gemisch aus kondensierten und hydrolysierbaren Gerbstoffen sowie die Gerbstoffvorstufen (+)-Catechin, (+)-Gallocatechin, (-)-Epicatechin, (-)-Epigallocatechin, (-)-Epicatechingallat und (-)-Epigallocatechingallat enthält. Neben Aminosäuren und Peptiden konnten verschiedene Sterine, Sterinester und Lipide nachgewiesen werden. Neue Substanzen wurden nicht aufgefunden.

Aus den Untersuchungen des Granulozytentests geht hervor, daß vermutlich niedermolekulare Verbindungen vom Typ der Polyphenole und ein Aminosäure-Peptid-Gemisch für die schwache immunologische Wirkung der wässrigen Drogenextrakte bei der Anwendung als Prophylaktikum und Therapeutikum verschiedenster Infektionen verantwortlich sind.

Als Erklärung für die Anwendung der Droge als Externum gegen bakterielle Hauterkrankungen kommen die schwach bakteriostatischen Eigenschaften phenolischer Verbindungen in Frage.

Die beschriebene Schutzwirkung bei Vergiftungen dürfte durch den hohen Gerbstoffanteil der Droge zustande kommen, da Gerbstoffe durch verschiedene Mechanismen Giftstoffe zu "neutralisieren" vermögen. So werden z.B. stickstoffhaltige Verbindungen, insbesondere Alkaloide, und Schwermetallsalze durch Gerbstoffe gebunden und bei der Darmpassage nur in geringem Maße wieder freigesetzt. Peptide und giftige Proteine können durch Gerbstoffe denaturiert und ausgefällt werden (209).

Eine hepatoprotektive Wirkung der Okoubaka-Droge ist nicht vorhanden.

KAPITEL 6:

## Immunologisches Screening niedermolekularer Pflanzeninhaltsstoffe

Die Isolierung immunstimulierend wirkender Alkaloide aus Uncaria tomentosa und niedermolekularer phenolischer Verbindungen aus Okoubaka aubrevillei hatte gezeigt, daß die volksmedizinische Verwendung dieser Drogen zur Tumor- und Infektionsbekämpfung zumindest teilweise auf chemisch definierte niedermolekulare Verbindungen mit Wirkung auf das Immunsystem zurückgeführt werden kann. Außerdem bestätigen diese Untersuchungen, daß die Zahl der im Pflanzenreich verbreiteten niedermolekularen Verbindungen mit dieser Wirkung ebenso groß sein dürfte wie die der Polymerverbindungen.

Im folgenden wurde durch Screening-Untersuchungen versucht, weitere niedermolekulare Substanzen mit phagozytosesteigernder Wirkung aufzufinden.

### 1. Alkaloide

#### 1.1. Im Granulozytentest wirksame Alkaloide

a) Nachdem sich bereits von insgesamt 6 getesteten Uncaria-Alkaloiden 4 Verbindungen als immunologisch wirksam erwiesen hatten (Kapitel 4, D. 1.1., S. 65), wurden 4 weitere in Uncaria-Arten vorkommende Indolalkaloide untersucht. Dazu gehörten das pentacyclische Oxindol Speciophyllin und die tetracyclischen Heteroyohimbine Dihydrocorynanthein, Hirsutin und Hirsutein.
Alle getesteten Verbindungen zeigten im Granulozytentest ein ähnliches Verhalten: in der höchsten Konzentration von $10^{-1}$% wurden die Granulozyten zerstört, in den Verdünnungen von $10^{-3}$% bis $10^{-5}$% erhielten wir Steigerungsraten zwischen 25% und 35%. In Verdünnungen ab $10^{-6}$% konnte keine Wirksamkeit mehr verzeichnet werden (Tabelle 24, S. 103).

Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Pteropodin, Isomitraphyllin und Isorhynchophyllin. Lediglich bei dem sehr stark stimulierenden Isopteropodin (maximale Steigerungsrate 55% bei einer Konzentration von $10^{-4}$%) konnten wir in Verdünnungen von $10^{-6}$% noch eine signifikante Wirkung beobachten.

Damit stellen die Uncaria-Alkaloide eine Gruppe wirksamer Phagozytosestimulatien dar, wodurch der Einsatz von verschiedenen Uncaria-Species, vor allem als Wundheilungsmittel (s.Kapitel 4, A. 1., S. 36) gerechtfertigt erscheint.

b) Die Wurzel von Gelsemium sempervirens (Loganiaceae) wird zur Vorbeugung und Behandlung von Grippe und grippalen Infekten benutzt (23). Die Hauptinhaltsstoffe sind Gelsemin (Oxindolalkaloid) und Sempervirin (Indolalkaloid vom Yohimbintyp). Während bei Gelsemin eine starke Steigerung der Phagozytose zu beobachten war, zeigte Sempervirin keine Wirkung.

c) Die Blätter von Cynanchum vincetoxicum (Asclepidiaceae) werden bei Fieber und zur Wundheilung eingesetzt (23). Das Hauptalkaloid Tylophorin, ein Isochinolinalkaloid, erwies sich im Granulozytentest als phagozytosestimulierend. Tylophorin kommt auch in der gegen allergisches Asthma und allergische Rhinitis angewendeten Pflanze Tylophora asthmatica vor.

d) Das Isochinolinalkaloid Emetin, isoliert aus Cephäelis accuminata (Rubiaceae) wird seit seiner Entdeckung als Chemotherapeutikum bei Amöbenruhr verwendet (23). Später wurde Emetin u.a. auch erfolgreich zur Behandlung verschiedener bakterieller Infektionen (210) und bei Hepatitis A und B (211) eingesetzt. Diese Anwendungen und bisher noch unveröffentlichte Berichte (212) deuten auf eine mögliche immunstimulierende Wirkung. Diese Vermutung wurde durch den Granulozytentest bestätigt. Die Verbindung ist neben dem Isopteropodin das stärkste bisher ge-

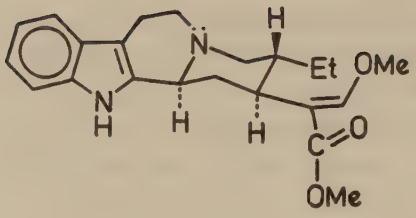
testete niedermolekulare Phagozytosestimulans. Noch bei Konzentrationen von $10^{-6}$% erhielten wir eine Steigerungsrate von 51%. Interessanterweise ist aber bei $10^{-7}$% keine Wirksamkeit mehr zu verzeichnen.

Die Testergebnisse und Formeln dieser immunologisch wirksamen Alkaloide sind in Tabelle 24 und Abbildung 20, S. 104, wiedergegeben.

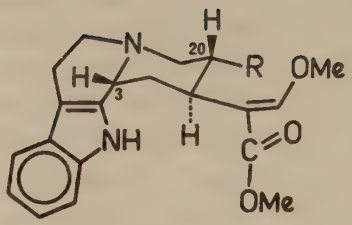
Tabelle 24: Prozentuale Phagozytosesteigerung verschiedener Alkaloide im Granulozytentest

| Alkaloid-HCl | $10^{-1}$% | $10^{-2}$% | $10^{-3}$% | $10^{-4}$% | $10^{-5}$% | $10^{-6}$% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Dihydrocorynanthein | cyt. | 8.9 | 30.1 | 24.5 | 31.2 | 9.6 |
| Hirsutin | cyt. | 12.0 | 14.5 | 26.5 | 31.2 | - |
| Hirsutein | cyt. | - | 32.0 | 32.9 | 28.1 | - |
| Speciophyllin | cyt. | 10.5 | 18.5 | 26.0 | 35.3 | - |
| Gelsemin | cyt. | 22.1 | 40.4 | 33.7 | 8.2 | - |
| Tylophorin | cyt. | 6.0 | 26.7 | 22.1 | 23.4 | 26.8 |
| Emetin | cyt. | - | 10.0 | 25.9 | 44.5 | 51.7 |

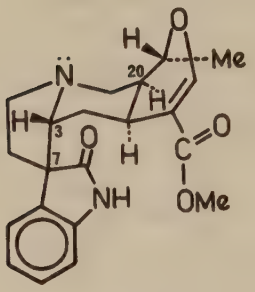
Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens zwei Testungen.



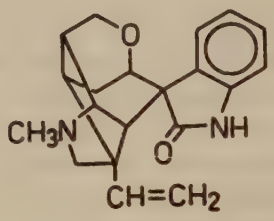
Dihydrocorynanthein



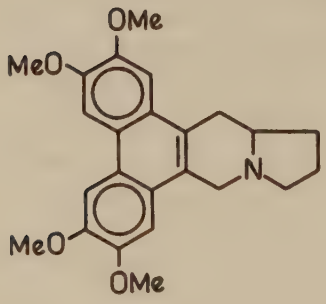
Hirsutin: R = $CH_2$-$CH_3$
Hirsutein: R = CH=$CH_2$



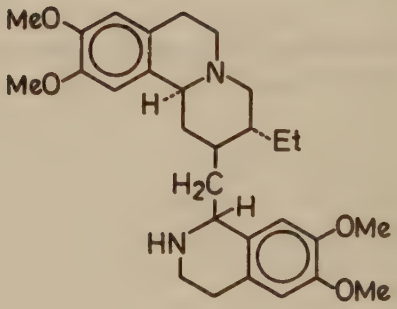
Speciophyllin



Gelsemin



Tylophorin



Emetin

Abb. 20

Phagozytosestimulierende Alkaloide

## 1.2. Im Granulozytentest unwirksame Alkaloide

Das Isochinolinalkaloid Berberin, das vor allem bei viralen Augenentzündungen angewendet wird, war im Gegensatz zu Tylophorin und Emetin in Konzentrationen bis zu $10^{-4}$% unwirksam.
Allerdings wirkt Berberin noch in Verdünnungen bis zu $2 \times 10^{-6}$% auf Ehrlich-Ascites-Tumorzellen toxisch (213). Eine Wirkung in sehr viel höheren Verdünnungen als bisher untersucht ist daher nicht auszuschließen.

Auch beim Vincristin (Indolalkaloid vom Aspidospermintyp), Camptothecin (Chinolinalkaloid) und Colchicin konnten wir bis zu Verdünnungen von $10^{-6}$% keine Wirkungen verzeichnen. Alle drei Verbindungen sind bekannte Mitosehemmer und werden daher als Cancerostatika eingesetzt (214,215). ZEIGLER (216) stellte für Vincristin sogar eine in-vitro-Hemmung der Makrophagen-Phagozytose bei Konzentrationen von $10^{-4}$% und $10^{-5}$% fest.

Die Chinolizidinalkaloide Cytisin und Spartein, Hauptalkaloide der bei septischen Erkrankungen und Geschwüren eingesetzten ganzen Pflanze von Baptisia tinctoria (Fabaceae) (23), zeigten ebenfalls bis zu Konzentrationen von $10^{-4}$% keine Wirkung, obwohl als Bestandteil z.B. von Esberitox® eine solche Wirkung zu erwarten gewesen wäre. Allerdings besitzt Spartein eine hohe Cytotoxizität und wird ebenfalls als Cancerostatikum eingesetzt (217). Auch in diesem Fall müßten noch höhere Verdünnungen getestet werden.

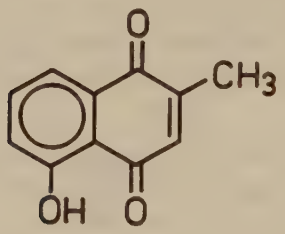
Negativ verliefen auch die Teste mit den von LIN (218) aus Thalictrum faberi (Ranunculaceae) isolierten Bisbenzylisochinolinalkaloiden Thalifaberin, Thalifabin und Huangshanin (getestet bis $10^{-4}$%). Die Pflanze wird in der chinesischen Volksmedizin als Antiphlogistikum und zur Behandlung von Magenkrebs eingesetzt. Evtl. beruht hier der Wirkmechanismus ähnlich wie bei den Bisbenzylisochinolinen Cephyranthin und Berbamin auf einer Steigerung der Leukozytenzahl im Blut (40,41).

## 2. Untersuchung weiterer niedermolekularer Verbindungen

### 2.1. Polyphenole, Chinone, Pflanzensäuren

Die Wirksamkeit einiger in Gerbstoffen vorkommender Polyphenolsäuren wurde bereits bei der Untersuchung von Okoubaka aubrevillei nachgewiesen (Kapitel 5, C. 4., S. 97).

Plumbagin, ein Hydroxychinonderivat, zeigte in Verdünnungen von $10^{-5}$% eine Phagozytosesteigerungsrate von 33%. In Konzentrationen von $10^{-1}$% und $10^{-2}$% wirkte die Verbindung dagegen phagozytosehemmend. Plumbagin kommt u.a. in Drosera rotundifolia (Droseraceae) vor.




Plumbagin

Die Carminsäure, ein Anthrachinonderivat, die als Adjuvans bei verschiedenen Infektionsmodellen an der Maus mit positivem Ergebnis getestet wurde (219), zeigte im Granulozytentest bis zu Konzentrationen von $10^{-3}$% eine phagozytosehemmende Wirkung. Testungen in höherer Verdünnung wurden noch nicht durchgeführt.

Die in vielen Pflanzen (z.B. Rosmarinus officinalis, Melissa officinalis) vorkommende Rosmarinsäure wirkt in Dosen zwischen 0.1 und 10 mg/kg (Ratte) antiphlogistisch (220). Im Granulozytentest war die Verbindung bis zu einer Verdünnung von $10^{-6}$% unwirksam. Ein "Umschlagen" der Wirkung, wie wir

sie bei den Uncaria-Alkaloiden beobachten konnten (Kapitel 4, D. 2., S. 71) trat hier nicht ein.

## 2.2. Terpene

VOLLMAR (221) beschreibt phagozytosesteigernde Eigenschaften einiger Sesquiterpenlactone aus Eupatorium cannabinum und E. perfoliatum (Asteraceae). Die Drogen werden bei Grippe und Erkältungskrankheiten eingesetzt (23). Besonders wirksam waren dabei Euperfolin und Eufoliatin. Das Wirkungsmaximum beider Substanzen lag bei $10^{-5}$% mit Steigerungsraten von 42.2% bzw. 26.7%. Die Wirksamkeit wurde im Chemilumineszenz-Test bestätigt.

BAUER (222) fand eine immunstimulierende Wirkung des tetracyclischen Triterpens Cucurbitacin E. Das Wirkungsoptimum lag mit einer Steigerungsrate von 25.0% bei einer Konzentration von $10^{-6}$%. Cucurbitacin E wurde aus Bryonia dioica (Cucurbitaceae) isoliert. Die Droge wird u.a. bei septischen Erkrankungen angewendet (23).

Auch einige Saponine erwiesen sich in Vorversuchen mit Substanzgemischen als wirksam (223).

## 3. Diskussion der in Kapitel 6 erhaltenen Ergebnisse

Das Ergebnis der von uns untersuchten Verbindungen bestätigt die in Kapitel 1, S. 4, gemachte Beobachtung, daß niedermolekulare immunstimulierend wirkende Substanzen bevorzugt in bestimmten Stoffgruppen auftreten.

Beim jetzigen Stand der Untersuchungen können allerdings noch keinerlei Struktur-Wirkungs-Beziehungen erstellt werden. Außerdem ist der Mechanismus der Stimulation in jedem Falle noch ungeklärt. Nicht sicher ist, ob und inwieweit innerhalb eines Strukturtyps Spezifitätsunterschiede bestehen. Möglicherweise ist das Ergebnis bei den Oxindolisomerenpaaren Isomitraphyllin/Mitraphyllin und Isorhynchophyllin/Rhynchophyllin ein Hinweis für strukturspezifische Wirkungen, da jeweils nur das A-Isomere wirkte.

Dagegen scheinen die Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei allen getesteten Verbindungen einem einheitlichen Schema zu unterliegen. Immunstimulierend wirkende Substanzen sind meist bei einer Konzentration von $10^{-1}$% cytotoxisch, während das Wirkungsoptimum der Phagozytosesteigerung in der Regel zwischen $10^{-3}$% und $10^{-5}$% liegt. Bei besonders stark stimulierenden Verbindungen wie Isopteropodin und Emetin befindet sich das Maximum der Stimulierung sogar im Bereich von $10^{-4}$% - $10^{-6}$%.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Um Anhaltspunkte für eigene immunologische Untersuchungen zu erhalten, wurde in einer umfangreichen Literatur-Recherche eine Liste bisher bekannter niedermolekularer Pflanzeninhaltsstoffe und aus der Volksmedizin bekannter Drogen mit möglichen immunmodulierenden Eigenschaften zusammengestellt.

2. Für ein immunologisches Screening von Drogenextrakten und Reinsubstanzen wurden verschiedene gut reproduzierbare Testmodelle eingerichtet. Die Untersuchung der Phagozytosesteigerung von neutrophilen Granulozyten, die primär mit dem Granulozytentest modifiziert nach BRANDT durchgeführt wurde, konnte für die Austestung von Reinsubstanzen durch die effizienter arbeitende neue Chemilumineszenzmethode ersetzt werden. Dabei eignete sich die Vollblutmethode zur Vorauswahl von immunstimulierend wirkenden Substanzen. Die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven war durch die Chemilumineszenz-Messung mit isolierten Granulozyten möglich. Diese Methode ist in ihrer Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit dem Granulozytentest gleichwertig. Die Dosis-Wirkungs-Kurven beider Verfahren sind vergleichbar.

   Als in-vivo-System zur Überprüfung einer Stimulation des Reticuloendothelialen Systems diente der Carbon-Clearance-Test nach BIOZZI, der für Screening-Untersuchungen vereinfacht wurde.

3. Aus der in der Volksmedizin als Wundheilungsmittel eingesetzten südamerikanischen Droge Uncaria tomentosa wurde ein Oxindolalkaloidgemisch mit immunstimulierenden Eigenschaften isoliert. Nach Reindarstellung und Aufklärung der 6 in diesem Gemisch vorliegenden Alkaloide wurden sie im Granulozytentest untersucht. Isopteropodin, ein pentacyclisches Oxindol der allo-Serie, wies bei einer Konzentration von $10^{-4}$% mit einer Phagozytosesteigerungsrate von 55% die stärkste Wirksamkeit auf. Sein Isomer Pteropodin, das pentacyclische Oxindol der normal-Serie Isomitraphyllin und das ebenfalls aus der normal-Serie

stammende tetracyclische Oxindol Isorhynchophyllin waren mit einer Steigerungsrate zwischen 22% und 27% bei Konzentrationen von $10^{-3}$% und $10^{-4}$% etwa gleich stark wirksam.

Die Alkaloide Mitraphyllin und Rhynchophyllin waren dagegen unwirksam.

4. Es wurde ein Screening-Verfahren entwickelt, mit dem der Alkaloidgehalt und das Alkaloidmuster von Uncaria-Drogen erfaßt werden konnte. Dabei kam die für diese Verbindungsklasse neu entwickelte Ionenpaarchromatographie zur Anwendung.

   Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Uncaria-Drogenextrakten zeigten eine Korrelation zwischen dem phytochemischen Screening-Verfahren und der immunologischen Untersuchung im Granulozytentest. Je höher der Alkaloidgehalt und je höher die Isopteropodin-Konzentration war, desto stärker stimulierte der Extrakt die Phagozytose.

5. Aus der bisher noch nicht untersuchten westafrikanischen Droge Okoubaka aubrevillei wurden die Verbindungen Catechin, Gallocatechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Epicatechingallat, Epigallocatechingallat, Gallussäure und Protocatechusäure isoliert. Im n-Hexan-Auszug ließen sich Stigmasterin und β-Sitosterin neben Lipiden und Sterinestern nachweisen. Von den isolierten Verbindungen erwiesen sich die niedermolekularen Polyphenole Epicatechingallat, Epigallocatechingallat, Gallussäure sowie Protocatechusäure als immunologisch wirksam.

6. In einem immunologischen Screening konnte bei folgenden weiteren niedermolekularen Pflanzeninhaltsstoffen phagozytosesteigernde Wirkungen nachgewiesen werden: Dihydrocorynanthein, Hirsutin, Hirsutein, Speciophyllin und Gelsemin (Indolalkaloide), Tylophorin und Emetin (Isochinolinalkaloide), Plumbagin (Chinonderivat), Euperfolin, Eufoliatin und Cucurbitacin E (Terpene).

# EXPERIMENTELLER TEIL

## I. Herkunft der Drogen und Vergleichssubstanzen

### 1. Herkunft der Drogen

#### 1.1. Uncaria-Arten

a) Wurzel der braunen Varietät von Uncaria tomentosa für phytochemische Untersuchungen von K.Keplinger, Innsbruck (Juli 1981)

b) Herbarmaterial der braunen, weißen und roten Varietät von Uncaria tomentosa für Screening-Untersuchungen von K.Keplinger, Innsbruck (gesammelt im August 1981 und Juli 1983 in Peru)

c) Herbarmaterial von Uncaria guainensis für Screening-Untersuchungen von K.Keplinger, Innsbruck (gesammelt im Juni 1983 in Peru).

#### 1.2. Okoubaka aubrevillei

Getrocknete Rinde von Okoubaka aubrevillei

a) Deutsche Homöopathie-Union, Karlsruhe (Mai 1980, Mai 1982)

b) Dr.M.Ilyas, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Zaria, Nigeria (September 1982).

### 2. Herkunft der Vergleichssubstanzen für die phytochemischen Arbeiten

#### 2.1. Uncaria tomentosa

a) Isomitraphyllin, Mitraphyllin, Isorhynchophyllin, Rhynchophyllin, Hirsutin, Dihydrocorynanthein und Speciophyllin: Prof.Dr.J.D.Phillipson, School of Pharmacy, University of London.

b) Hirsutein: Prof.Dr.S.Sakai, Ciba University, Ciba/Japan

c) Isopteropodin und Pteropodin

2 mg Speciophyllin wurden 20 Stdn. in 5 ml Pyridin am Rückfluß erhitzt, zur Trockene eingeengt und 2mal mit 10 ml Ether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherextrakte ergaben nach Trocknen über $Na_2SO_4$ und Eindampfen 1.6 mg einer hellgelben, öligen Flüssigkeit. In 2 ml Ethylacetat aufgenommen wurde das Isomerisierungsprodukt über 7 HPTLC-Platten durch zweimalige stufenförmige Entwicklung (5 cm, 10 cm) im LM Ethylacetat-Isopropanol-$NH_3$konz. (100:2:1) aufgetrennt, im UV 254 nm detektiert und die beiden oberen Zonen mit $R_f$ 0.85 und 0.8 ausgeschabt, mit Ethylacetat-Methanol (1:1) vom Kieselgel eluiert und einrotiert.

Obere Bande: Isopteropodin, 0.6 mg, Smp.: 205°C
Untere Bande: Pteropodin, 0.4 mg, Smp.: 214°-217°C

2.2. Okoubaka aubrevillei

a) Aminosäuren,(-)-Epicatechin, (+)-Gallocatechin, (-)-Epigallocatechin, Protocatechusäure, Gallussäure, β-Sitosterin,Stigmasterin: Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München

b) (+)-Catechin: Fa.C.Roth, Karlsruhe

3. Herkunft der Substanzen für immunologische Untersuchungen

Berberinsulfat, Colchicin, Huangshaninhydrochlorid, Rosmarinsäure, Thalifaberin-, Thalifabin- und Tylophorinhydrochlorid wurden von Mitarbeitern des Lehrstuhls Professor Dr.H.Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München isoliert.

Das Natrium-Salz des Camptothecins erhielten wir von Dr.M.Rüffer am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Cytisin, Emetindihydrochlorid, Gelseminhydrochlorid, Plumbagin, Sempervirinnitrat,Spartein- und Vincristinsulfat wurden von Fa.C.Roth, Karlsruhe, bezogen.

Das Natriumsalz der Aristolochiasäure (Gemisch aus AS I und AS II) wurde von der Fa.Dr.Madaus zur Verfügung gestellt.

Die Carminsäure wurde von der Fa.Merck, Darmstadt, bezogen.

## II. Phytochemische Bearbeitung von Uncaria tomentosa

### 1. Allgemeine Arbeitsmethoden

#### 1.1. Gewinnung der Rohalkaloide

Das getrocknete, pulverisierte Drogenmaterial wurde mit 10% $NH_3$ durchfeuchtet, eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen und unter IR-Licht schonend getrocknet. Anschließend mazerierte man die Droge mit Ethylacetat vier Tage am Magnetrührer, engte den Rohextrakt ein und schüttelte 3mal mit 2%iger $H_2SO_4$ aus. Die wässrige Phase wurde mit festem $Na_2CO_3$ bis zur alkalischen Reaktion bei pH 8 - 9 (Alkalit $^R$-Teststäbchen pH 7.5 - 14, Merck) versetzt und 3mal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die über $Na_2SO_4$ getrocknete organische Phase enthielt die Alkaloide in angereicherter Form.

#### 1.2. Herstellung von Mazeraten für pharmakologische Testungen

Die pulverisierte, getrocknete Droge wurde mit dem Extraktionsmittel im Verhältnis 1:10 versetzt, 2 Tage bei Raumtemperatur am Magnetrührer extrahiert, filtriert und das Filtrat zur Trockene eingeengt. Sollen Alkaloide ausgezogen werden, feuchtet man vor der Mazeration mit 10% $NH_3$ an, läßt 1/2 Stde. bei Raumtemperatur stehen und trocknet anschließend unter IR-Licht.

#### 1.3. Hydrochlorid-Darstellung der Alkaloide für pharmakologische Testungen

Die freien Alkaloidbasen wurden in Ether gelöst und HCl-Gas aus einer Gasbombe eingeleitet. Die Hydrochloride

fielen weiß aus. Der Ether wurde abrotiert, die Hydrochloride nochmals mit wasserfreiem Ether gewaschen und anschließend über Phosphorpentoxid im Vakuumexsiccator getrocknet.

## 1.4. Fällungsreagens für Alkaloide

Kaliumquecksilberiodid-Lösung (Valsers-Reagens) (129)

15 g Quecksilber-(II)-iodid werden in 100 ml 10%iger Kaliumiodidlösung gelöst und filtriert. Aus der mit 1% HCl angesäuerten Testlösung müssen letzte Reste organischer Lösungsmittel entfernt werden, da sonst leicht ein positiver Alkaloid-Nachweis vorgetäuscht wird.

## 1.5. Nachweis von Alkaloid-N-Oxiden in Methanol-Extrakten (133)

Zur Überprüfung auf evtl. in Methanolextrakten vorliegende N-Oxide wurden 10 mg des aus alkalisiertem Drogenmaterial gewonnenen Methanolextraktes auf 3 0.5 mm Kieselgel-Fertigplatten präparativ aufgetragen, im LM I bis zu einer Höhe von 10 cm entwickelt, die Substanzen im Startbereich bis zum $R_f$ 0.1 im UV 254 nm und UV 366 nm detektiert, markiert, ausgeschabt und mit 3 x 50 ml Methanol am Magnetrührer vom Kieselgel eluiert. Darauf wurde abdekantiert, durch eine G4-Fritte filtriert und das Filtrat eingeengt.

Eine Glassäule (Ø 2 cm, Länge 25 cm) wurde mit 10 g Serdoxit $^{R}$ (Fa.Serva,Heidelberg) beschickt. Durch Spülen mit einer 5% Natriumdithionit-Lösung in Wasser muß das schwarze oxidierte Serdoxit $^{R}$-Harz in die hellbraune sauerstoffaufnahmefähige Form überführt werden. Zur Entfernung überschüssigen Natriumdithionites wurde mit 30 ml Wasser und 20 ml Methanol gespült. Das Filtrat (5 mg/15 ml Methanol) konnte direkt mit ca. 50 ml Methanol von der Säule eluiert werden (Tropfgeschwindigkeit 10 Tr./min). Im Eluat befanden sich u.a. die reduzierten Alkaloide. Nach Säure-Basen-Ausschüttelung (s. 1.1., S. 113) wurde die Ethylacetat-Phase im LM II chromatographiert und im UV 254/366 nm und mit Dragendorff-Reagens detektiert. Eine positive Alka-

loidreaktion zeigte das Vorliegen von N-Oxiden in dem untersuchten Pflanzenmaterial an.

## 1.6. DC-Verfahren

Adsorbentien für analytische und präparative DC:

Kieselgel 60 $F_{254}$-Fertigplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.25 mm, Fa.Merck

Kieselgel 60 $F_{254}$-Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC-Platten) 10 x 20 cm, Fa.Merck

Kieselgel 60 $F_{254}$-Fertigplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.5 mm, Fa.Merck (nur für präparative DC)

Auftragetechnik:

analytisch: bandförmig mit ausgezogenem Kapillarröhrchen

präparativ: bandförmig mit schablonegeführter Mikroliter-Pipette, deren Öffnung mit wenig Watte verschlossen wurde

Laufmittelsysteme:

a) für analytische DC:

LM I Chloroform-Aceton (5:4)

LM II: Chloroform-Ethanol (95:5)

LM III: Ethylacetat-Isopropanol-$NH_3$konz. (100:2:1)

b) für präparative DC:

LM IV: n-Hexan-Chloroform-Aceton (1:9:1)

LM V: Chloroform-Aceton (9:1)

Detektion:

a) auf Kieselgel $F_{254}$ Löschung im UV 254 nm

b) Eigenfluoreszenz im UV 366 nm

c) Sprühreagentien zum Nachweis der Alkaloide:

Dragendorffs Reagens nach MUNIER und MACHEBOEUFF (131):

Lsg. a) 0.85 g bas.Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst

Lsg. b) 8 g Kaliumiodid werden in 20 ml Wasser gelöst

Vorratslösung: Gleiche Volumina der Lsg. a) und b) werden gemischt.

Sprühlösung: 10 ml Vorratslösung und 20 ml Eisessig werden mit 100 ml Wasser gemischt. Alkaloide zeigen eine typische orange-braune Färbung.

Nachbehandlung:

a) Zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit bei sehr geringen Auftragemengen kann nach Lufttrocknung der Platten mit 10% wässriger Natriumnitritlösung nachbesprüht werden. Die dabei entstehende Braunfärbung verschwindet innerhalb weniger Minuten wieder.

b) Bei Screening-Untersuchungen kann zur Differenzierung und der einzelnen Uncaria-Alkaloide die Dragendorff-Platte mit 0.2M $FeCl_3$ in 35% $HClO_4$ nachbesprüht werden (130). Nach Erhitzen bei 100°C zeigen sich die Alkaloidgruppen mit unterschiedlichen Farben (vgl. Tabelle 25, S. 117)

Ehrlichs-Reagens (132) für tetracyclische Heteroyohimbine

Sprühlösung: 1 g Dimethylaminobenzaldehyd wird zu 100 ml Ethanol (96%) gelöst.

Nachbehandlung: Besprühtes Chromatogramm 3 - 5 min in eine mit HCl-Dämpfen gesättigte Kammer einstellen. Evtl. Platte anschließend erwärmen. Die tetracyclischen Heteroyohimbine reagieren unter Dunkelrot-Färbung.

Tabelle 25: Detektionsverhalten von Uncaria-Alkaloiden auf Kieselgelplatten

| Alkaloid | UV 254 nm Löschung | UV 366 nm Eigenfluoreszenz | Dragendorff + $FeCl_3/HClO_4$ | Ehrlichs-Reagens |
|---|---|---|---|---|
| tetracyclische Heteroyohimbine: | | | | |
| Dihydrocorynanthein | + | weißblau | braun | dunkelrot |
| Hirsutin | + | weißblau | braun | dunkelrot |
| Hirsutein | + | weißblau | braun | dunkelrot |
| pentacyclische Oxindole: | | | | |
| Isomitraphyllin | + | - | rosa | - |
| Mitraphyllin | + | - | rosa | - |
| Isopteropodin | + | - | grau — rosa | - |
| Pteropodin | + | - | grau — rosa | - |
| Speciophyllin | + | - | grau — rosa | - |
| tetracyclische Oxindole: | | | | |
| Isorhynchophyllin | + | - | rosa | - |
| Rhynchophyllin | + | - | rosa | - |
| Rotundifolin | + | - | blau — braun | hellrot |
| Isorotundifolin | + | - | blau — braun | hellrot |

## 1.7. Säulenchromatographie

Adsorbentien

a) Zur Trennung des Rohalkaloidgemisches
   Kieselgel 60 Merck (Korngröße 0.063 - 0.200)

b) Zur Isolierung von A5
   Kieselgel 60 Merck (Korngröße unter 0.063)

Laufmittel

LM VI: Chloroform-Aceton (6:3)

LM VII: Chloroform-Ethylacetat-Gradient (siehe 2.2., S. 121)

Packtechnik

Das Kieselgel wurde mit den entsprechenden Laufmitteln zu einer homogenen Suspension angerührt und in eine Glassäule eingegossen. Die Füllung wurde mit einem Rundfilter und wenig Seesand bedeckt. Vor dem Auftragen des Trennmaterials wurde solange mit dem Elutionsmittel gewaschen, bis die Füllhöhe konstant blieb. Der zu trennende Extrakt wurde mit wenig Kieselgel angerieben, vorsichtig auf die Säule aufgegeben und mit wenig Seesand bedeckt. Durch Aufsetzen einer zweiten, mit Elutionsmittel gefüllten Säule ließ sich der hydrostatische Druck erhöhen und damit die Trennung verbessern.
Das Eluat wurde mit einem automatischen Fraktionsschneider aufgefangen.

## 1.8. Analytische Ionenpaarchromatographie

HPLC-Apparatur:

| | |
|---|---|
| Pumpe: | Serie 1 (Fa.Perkin-Elmer) |
| Einspritzblock: | U6K (Fa.Waters) |
| Detektor: | Schoeffel SF 770, Spektralphotometer |
| Schreiber: | Recorder 56 (Fa.Perkin-Elmer) |
| Säule: | µ-Bondapak C18 (Fa.Waters), Stahlsäule (7.9 x 300 mm) gefüllt mit C18 reversed-phase Kieselgel von 10 µm Partikelgröße |
| Kapillaren: | Stahl, 0.5 mm Innendurchmesser |
| Integrator: | M3 (Fa.Perkin-Elmer) |
| Detektion: | 243 nm, range 0.1 |
| Papiervorschub: | 5 mm/min |

Trennbedingungen:
Als Fließmittel für die HPLC wurden ausschließlich Lösungsmittel in ChromAR-Qualität der Fa.Promochem, Wesel, verwendet, jeweils mit einem Zusatz von 2.2% PIC B7 (Fa.Waters), dies entspricht 5 mM Heptansulfonsäure-Natrium-Salz und 15 mM Essigsäure.

a) Trennung der penta- und tetracyclischen Oxindolalkaloide (TS I)
Fließmittel: Acetonitril-Wasser (25:75) + PIC B7
Durchfluß: linearer Gradient von 2 ml/min auf 3 ml/min innerhalb von 20 min

b) Trennung der tetracyclischen Heteroyohimbine (TS II)
Fließmittel: Acetonitril-Wasser (40:60) + PIC B7
Durchfluß: isokratisch 2 ml/min

Vorbereitung der Probenlösungen
Als Lösungsmittel für alle Proben wurde Methanol p.a. verwendet. Zur Entfernung von Schwebstoffen wurden die Probelösungen vor der Chromatographie membranfiltriert (Teflonfilter, Ø = 4 µm, Fa.Sartorius).

Einspritzmenge
Reinsubstanzen: 20 - 50 µl einer 0.1% Lösung
Rohalkaloidgemische: 20 µl einer 1% Lösung

## 1.9. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte
Die Substanzen wurden im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Schmelzpunkte bestimmten wir auf der Kofler-Heizbank der Fa.Reichert, Wien. Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Optische Drehung
Die Messung erfolgte im Lichtelektronischen Polarimeter der Fa.Zeiss (LEP A 2), die Substanzen wurden in Chloroform UVASOL $^{R}$ der Fa.Merck gelöst.

UV-Spektren
Die UV-Spektren wurden in methanolischer Lösung mit dem UV-Spektrometer DB-GT der Fa.Beckman gemessen.

IR-Spektren

Die Substanzen wurden in Kaliumbromid gepreßt mit einem Acculab-1 Spektrophotometer der Fa.Beckman gemessen. Die Konzentration betrug i.a. 1 mg/100 mg KBr.

Massenspektren

Die Messung erfolgte mit dem Massenspektrometer MS 30 der Fa.AEI.

Aufnahmebedingungen: 4 kV, 70 eV, 300 A, Ionenquellentemperatur (ST) 210°C, $10^{-6}$ Torr.

$^1$H-NMR-Spektren

Die Routinespektren (80 MHz) wurden am Institut für Pharmazeutische Biologie mit einem Bruker WP-80-Kernresonanzspektrometer aufgenommen.

## 2. Spezielle Arbeitsmethoden

### 2.1. Gewinnung des Rohalkaloids

750 g gepulverte Wurzel der braunen Varietät von Uncaria tomentosa wurden nach 1.1., S.113, extrahiert und einer Säure-Basen-Ausschüttelung unterworfen. Wir erhielten 6.75 g hellbraunes, pulverförmiges Rohalkaloidgemisch.

### 2.2. Säulenchromatographie

Isolierung von A6

1.5 g des mit wenig Kieselgel verriebenen Rohalkaloidgemisches wurden auf eine nach 1.6., S. 115, vorbereitete Kieselgelsäule (Ø 6 cm, Länge 60 cm, Adsorbensmenge 500 g) gleichmäßig auf die von wenig Elutionsmittel bedeckte Seesandschicht aufgetragen. Als Elutionsmittel diente LM I. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 40 - 45 Tr./min.

Das Eluat wurde in Reagensgläsern zu je 15 ml aufgefangen, Fraktionen mit gleichem DC-Bild vereinigt und im Vakuum eingeengt. Wir erhielten:

| | | |
|---|---|---|
| Fraktion I: | Gemisch aus A1, A2, A3, A4: | ca. 300 mg |
| Fraktion II: | A5 in angereicherter Form: | ca. 50 mg |
| Fraktion III: | A6 in reiner Form: | 17.5 mg |

Isolierung von A5

20 mg der Fraktion II wurde wie unter 2.2., S. 120, beschrieben auf eine Kieselgelsäule aufgebracht (Ø 2 cm, Länge 25 cm, Adsorbensmenge 100 g). Die Tropfgeschwindigkeit betrug 15 Tr./min, die Elution erfolgte mit einem Chloroform-Ethylacetat-Gradienten.

| | | | |
|---|---|---|---|
| LM I: | $HCCl_3$-EAc | 80:20 | ("Waschlösung", 600 ml) |
| LM II: | $HCCl_3$-EAc | 70:30 | 100 ml |
| LM III: | $HCCl_3$-EAc | 60:40 | 100 ml |
| LM IV: | $HCCl_3$EAc | 50:50 | 300 ml |
| LM V: | $HCCl_3$-EAc | 40:60 | (Nachlauf, 300 ml) |

Nach einem Vorlauf (LM II und LM III) wurde das Eluat mit dem automatischen Fraktionssammler in Reagensgläsern zu 10 ml aufgefangen und alle Fraktionen, die A5 in chromatographisch reiner Form enthielten, vereinigt.
Ausbeute: 5 mg.

## 2.3. Präparative Schichtchromatographie

Isolierung von A1 und A4

100 mg der Fraktion I der Säulenchromatographie wurden in MeOH-EAc (1:1) aufgenommen und wie beschrieben auf 50 0.25 mm-Kieselgelplatten aufgetragen (s. 1.6., S. 115).

Im LM IV wurde zunächst bis zu einer Laufhöhe von 5 cm und anschließend im LM V zweimal stufenförmig 7.5 cm und 10 cm entwickelt. Nach jedem Durchgang wurde das Fließmittel kalt abgeföhnt.

Die getrennten Banden wurden im UV 254 nm detektiert und mit Bleistift markiert. Die gekennzeichneten Flächen wurden ausgeschabt und das Kieselgel auf dem Magnetrührer dreimal 20 min lang mit je 15 ml MeOH-EAc (1:1) eluiert. Darauf wurde abdekantiert und durch eine Glasfritte G4 filtriert. Durch Membranfiltration erfolgte die Entfernung letzter Reste von Kieselgel (Sartorius Typ SM, Porengröße 0.45 µm).

Nach Einengen der Lösungen erhielten wir:

| | |
|---|---|
| A1: | 14.5 mg |
| A2/A3: | 15.3 mg |
| A4: | 34.1 mg |

Isolierung von A2 und A3

Das Gemisch von A2/A3 wurde wie unter 2.3., S. 121 beschrieben auf 20 HPTLC-Platten getrennt. Nach Membranfiltration wurden erhalten:

| | |
|---|---|
| A2: | 2.4 mg |
| A3: | 9.7 mg |

## 2.4. Isomerisierung von A1, A2 und A3

2 mg A1, 0.5 mg A2 und 1 mg A3 wurden jeweils 20 Stdn. in 5 ml Pyridin am Rückfluß erhitzt, zur Trockene eingeengt und 3mal mit 10 ml Ether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherextrakte jeder Substanz ergaben eine gelbe ölige Flüssigkeit, die im LM III auf HPTLC-Platten getrennt wurden. Die Detektion erfolgte im UV 254 nm und mit Dragendorff-Reagens.

A1 und A2 ergaben jeweils identische DC-Bilder mit 4 Isomerisierungsprodukten, aus A3 konnten lediglich 2 Alkaloide erhalten werden.

## 2.5. Identifizierung der isolierten Alkaloide

Isopteropodin (A1)

$C_{21}H_{24}O_4N_2$, MG: 368

Smp.: $204^{\circ}$ - $209^{\circ}C$

DC: $R_f$ 0.73 (LM I); 0.48 (LM II); 0.83 (LM III)

HPLC: Rt 8.8 min (TS I)

$[\alpha]_D^{24}$: $-85.1^{\circ}$ (c = 0.554/$CHCl_3$)

UV(MeOH): $\lambda_{max}$ = 208, 243, 283(sh)

MS: m/e (rel.Int.): 368 ($M^+$, 100), 223(70), 208(35), 180(14), 146(11), 145(9), 144(5), 130(25), 69(45)

Pteropodin (A2)

$C_{21}H_{24}O_4N_2$, MG: 368

Smp.: 214° - 219°C

DC: $R_f$ 0.72 (LM I), 0.47 (LM II), 0.81 (LM III)

HPLC: Rt 9.8 min (TS I)

UV(MeOH): $\lambda_{max}$ = 208, 243, 283(sh)

MS: m/e (rel.Int.): 368 ($M^+$, 100), 223(84), 208(25), 180(20), 146(8), 145(11), 144(11), 130(14), 69(35)

Isomitraphyllin (A3)

$C_{21}H_{24}O_4N_2$, MG: 368

Smp.: 96° - 105°C (Z)

DC: $R_f$ 0.71 (LM I), 0.47 (LM II), 0.80 (LM III)

HPLC: Rt 9.2 min (TS I)

$[\alpha]_D^{24}$: +14.5° (c = 0.758/$CHCl_3$)

UV(MeOH): $\lambda_{max}$ = 208, 243, 283(sh)

MS: M/e (rel.Int.): 368 ($M^+$, 70), 223(100), 208(10), 180(4) 146(6), 145(5), 144(7), 130(11), 69(29)

Mitraphyllin (A5)

$C_{21}H_{24}O_4N_2$, MG: 368

Smp.: 264° - 268°C

DC: $R_f$ 0.55 (LM I), 0.39 (LM II), 0.50 (LM III)

HPLC: Rt 10.4 min (TS I)

$[\alpha]_D^{24}$: -4.3° (c = 0.587/$CHCl_3$)

UV(MeOH): $\lambda_{max}$ = 208, 243, 283(sh)

MS: m/e (rel.Int.): 368 ($M^+$, 60), 223(100), 208(10), 180(4), 146(6), 145(7), 144(10), 130(10), 69(27)

Isorhynchophyllin (A4)

$C_{22}H_{28}O_4N_2$, MG: 384

Smp: 138° - 141°C

DC: $R_f$ 0.71 (LM I), 0.42 (LM II), 0.70 (LM III)

HPLC: Rt 13.9 min (TS I)

$[\alpha]_D^{24}$: +7.8° (c = 0.420/$CHCl_3$)

UV(MeOH): $\lambda_{max}$ = 208, 243, 283(sh)

MS: m/e (rel.Int.): 384 ($M^+$, 100), 239(80), 224(23), 210(14), 208(25), 146(6), 145(7), 144(10), 130(14), 69(75)

Rhynchophyllin (A6)

$C_{22}H_{28}O_4N_2$, MG: 384

Smp.: 214° - 216°C

DC: $R_f$ 0.36 (LM I), 0.25 (LM II), 0.31 (LM III)

HPLC: Rt 17.3 min (TS I)

$[\alpha]_D^{24}$: -15.1° (c = 0.551/$CHCl_3$)

UV(MeOH): $\lambda_{max}$ = 208, 243, 283(sh)

MS: m/e (rel.Int.): 384 ($M^+$, 100), 239(80), 224(30), 210(20), 208(24), 146(8), 145(12), 144(13), 130(10, 69(90)

## 2.6. HPLC von Uncaria-Alkaloiden ohne Zusatz von PIC-Reagens

Analysenbedingungen siehe 1.8., S. 118

Trennsystem 1: Trägermaterial: 5 µm-Spherisorb-ODS-Säule
Durchfluß: 2 ml/min
Fließmittel: Methanol-Wasser (80:20)

Trennsystem 2: Trägermaterial und Durchfluß s. TS 1
Fließmittel: Acetonitril-1%-Ammonium-carbonat (60:40)

Trennsystem 3: Trägermaterial: C 18 µ-Bondapak-Säule (s. 1.8., S. 118)
Durchfluß: 2 ml/min
Fließmittel: linearer Acetonitril-Wasser-Gradient (von Acetonitril-Wasser 70:30 auf Acetonitril 100% mit t = 15 min)

Folgende Rt-Werte (min) wurden erhalten:

| Alkaloid | 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|
| Hirsutin | 12.4 | 11.1 | 25.0 |
| Isomitraphyllin | 3.7 | 2.7 | 12.0 |
| Mitraphyllin | 3.3 | 2.9 | 7.4 |
| Isopteropodin | 3.6 | 3.5 | 8.2 |
| Pteropodin | 3.6 | 2.8 | 7.9 |
| Speciophyllin | 3.6 | 2.8 | 8.0 |
| Isorhynchophyllin | 3.1 | 3.1 | 7.9 |
| Rhynchophyllin | 5.0 | 5.1 | 20.5 |

## 2.7. Alkaloidanalyse durch Ionenpaarchromatographie

Die nach 1.1.,S. 113, gewonnenen Rohalkaloide der einzelnen Drogenmuster wurden in Methanol zu einer 1% Lösung aufgenommen und 2 µl einer 1%igen methanolischen Gelsemin-Stammlösung zupipettiert.

Sieben Minuten nach Beginn des Analysendurchlaufs wurde der elektronische Integrator eingeschaltet. Dadurch verhinderten wir die Integration des Lösungsmittelpeaks, des zugesetzten Gelsemins und der zu Beginn des Analysendurchlaufs eluierten nicht ionischen Bestandteile.

Die relative Peakfläche eines Alkaloids wurde nach der Formel

$$\text{relative Peakfläche} = \frac{\text{Einzelpeakfläche}}{\text{Gesamtpeakfläche}} \times 100\ (\%)$$

berechnet.

## 2.8. Bindung des Uncaria-Gesamtalkaloids an Catechingerbstoff nach OKUDA (168)

10 ml einer 1%igen wässrigen Lösung eines wasserlöslichen Catechinextraktes (pH 6.0) wurden mit 10 ml einer 0.1%igen wässrigen Lösung des Gesamtalkaloidgemisches versetzt, 24 Stdn. bei Raumtemperatur am Magnetrührer gerührt und anschließend gefriergetrocknet.

## III. Phytochemische Bearbeitung von Okoubaka aubrevillei

### 1. Allgemeine Arbeitsmethoden

#### 1.1. DC-Verfahren

Adsorbentien, Auftragetechnik

siehe II. 1.6., S. 115

Laufmittelsysteme

a) für Inhaltsstoff-Screening Laufmittel nach BITTNER (181) für Alkaloide, Flavonoide, Phenole
Ethylacetat-Methanol-Wasser (100:13.5:10)

b) "Alkaloide"
LM I: n-Hexan-Ethylacetat (1:9)
LM II: n-Hexan-Ethylacetat (1:2)

c) Aminosäuren
LM III: n-Butanol-Eisessig-Wasser (50:10:40) Oberphase
LM IV: n-Butanol-Aceton-Eisessig-Wasser (35:35:10:20)

d) Gerbstoffbestandteile
LM V: n-Butanol-Eisessig-Wasser (40:10:22)
LM VI: Chloroform-Eisessig-Wasser (50:45:5)

e) monomere Zucker: Chloroform-Methanol-Wasser (64:40:8)

f) Sterine, Sterinester und Lipide
LM VII: Toluol-Ethylacetat (5:4)
LM VIII: Toluol-Aceton (8:2)
LM IX: Toluol-Aceton (9:1)
LM X: Toluol-Aceton-Wasser (35:90:5)

Detektion

a) auf Kieselgel $F_{254}$ Löschung in UV 254 nm
b) Eigenfluoreszenz in UV 366 nm
c) Sprühreagentien

1. Cumarine, Flavonoide und Phenole

Methanolische Kalilauge auf Cumarine (181):
5 g KOH werden in 100 ml Methanol gelöst. Nach dem Besprühen werden die Platten getrocknet und im Tageslicht und UV 366 nm betrachtet.

Naturstoffreagens nach NEU auf Flavonoide (182):
Sprühlösung I: 1 g Diphenylborsäure-β-aminoethylester werden in 100 ml Ethanol gelöst
Sprühlösung II: 5%ige ethanolische Polyethylenglycollösung

Die Platten werden nacheinander mit den beiden Sprühlösungen besprüht und nach 10 min im UV 366 nm betrachtet.

Phenolreagens nach PAULY auf phenolische Verbindungen (183):
Lösung I: 4.5 g Sulfanilsäure werden in 45 ml $H_2SO_4$ konz. gelöst und mit $H_2O$ auf 500 ml aufgefüllt. 10 ml dieser Lösung mischt man unter Eiskühlung mit 10 ml einer 4.5%igen Natriumnitritlösung. Bei $0^oC$ aufbewahren (3 Tage)
Lösung II: 10%ige Natriumcarbonat-Lösung in Wasser
Sprühlösung: Gleiche Volumina von Lösung I und II werden gemischt.
Die Auswertung der Platten erfolgt im Tageslicht.

Eisen-III-chlorid-Lösung auf phenolische Verbindungen (184):
20%ige Eisen-III-chlorid-Lösung in Methanol.
Die besprühten Platten werden im Tageslicht betrachtet.

2. Catechine

Vanillin-Salzsäure (198):
1 g Vanillin werden in 50 ml HCl konz. gelöst (frisch bereiten). Catechine reagieren unter spontaner Rotfärbung.

p-Toluolsulfonsäure (199):
20 g p-Toluolsulfonsäure werden in 100 ml Ethanol gelöst. Die besprühten Platten werden 10 min bei $100^oC$ erhitzt, Catechine färben sich gelb.

3. Aminosäuren

Ninhydrin-Reagens (186):
200 mg Ninhydrin werden in 100 ml Ethanol gelöst und die besprühten Platten auf 100°C bis zur optimalen Farbentwicklung erhitzt. Aminosäuren ergeben violette bis rote Färbungen.

4. Alkaloide

Dragendorff nach MUNIER und MACHEBOEUFF (131):
(siehe II. 1.6., S. 115):

Jod-Plateat-Reagens (192):
Zu 5 ml einer 5%igen Hexachloroplatin-IV-säure-Lösung werden 45 ml einer 10%igen Kaliumjodid-Lösung gegeben und mit 100 ml Wasser verdünnt (frisch bereiten).
Die Auswertung erfolgt im Tageslicht.

VAN URK's Reagens auf Indolalkaloide (194):
200 mg 4-Dimethylaminobenzaldehyd werden in 100 ml 25%iger HCl gelöst und 1 Tropfen 10%ige Eisen-III-chloridlösung zugegeben. Auswertung im Tageslicht.

5. Zucker

Diphenylaminophosphorsäure (195):
2 ml Anilin, 2 g Diphenylamin und 10 ml 85%ige Phosphorsäure werden mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt. Die besprühten Platten werden 10 min bei 100°C erhitzt. Auswertung im Tageslicht.

6. Sterine

Liebermann-Burchard-Reagens (178):
Die Platte wird mit gleichen Teilen Essigsäureanhydrid und Chloroform besprüht und mit einer Glasplatte, auf die in dünner Schicht $H_2SO_4$ konz. aufgesprüht wurde, bedeckt. Nach einiger Zeit erscheinen Sterine als charakteristische rote Flecke.

Anisaldehyd-Schwefelsäure (179):
0.5 ml Anisaldehyd, 1 ml $H_2SO_4$ konz. und 50 ml Eisessig werden gemischt. Besprühte Platte auf 100°C erhitzen.
Auswertung im Tageslicht.

Komarowsky-Reagens (180):
1 Teil einer 2%igen methanolischen 4-Hydroxybenzaldehyd-Lösung und 1 Teil einer 5%igen $H_2SO_4$ werden gemischt. Nach 4minütigem Erhitzen auf 105°C erfolgt die Auswertung im Tageslicht.

Antimon-III-chlorid-Lösung (Carr-Price-Reagens) (193):
20 g Antimon-III-chlorid werden in 20 ml Eisessig und 60 ml Chloroform gelöst. Nach dem Besprühen wird 10 min auf 100°C erhitzt. Auswertung im Tageslicht und im UV 366 nm.

7. Lipide

Rhodamin 6-G-Lösung (201):
Gleiche Volumina einer 8%igen KOH und einer 0.006%igen Rhodamin 6-G-Lösung werden gemischt.
Lipide fluoreszieren im UV 366 nm gelb.

## 1.2. Fällungsreagentien für Alkaloide

a) Valsers Reagens (129): siehe II. 1.4., S. 114
b) Meyers Reagens (185): 1.36 g Quecksilber-II-chlorid werden in 60 ml Wasser gelöst, 10 ml 50%ige Kaliumiodid-Lösung zugegeben und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Analysenlösung wird vor Reagenszugabe mit 1% HCl angesäuert. Ein weißer Niederschlag deutet auf das Vorliegen von Alkaloiden.
c) Ammoniumreineckat-Lösung auf quarternäre Alkaloide (191): Eine gesättigte und filtrierte Reinecke-Salz-Lösung wird mit Salzsäure schwach angesäuert. Durch Zusatz einiger Tropfen dieser Lösung zu einer ebenfalls leicht angesäuerten Analysenlösung deutet eine starke rosarote Fällung auf das Vorliegen quarternärer Alkaloide hin.

## 1.3. Säulenchromatographie

Kieselgelchromatographie
Sorbens: Kieselgel 60 Merck (Korngröße 0.063 - 0.200)
Laufmittel: Ether-Aceton-Gradient (s. 2.3., S. 134)
Petrolether-Ether-Gradient (s. 2.4., S. 136)
Packtechnik: s. II. 1.7., S. 118

Polyamidchromatographie

Sorbens: Polyamid, hergestellt aus Ultramid B3 der Fa.BASF nach einem Institutsverfahren (224). Monomere Anteile wurden durch jeweils 3maliges Rühren mit Wasser und Methanol entfernt.

Elutionsmittel: Wasser

Ionenaustauschchromatographie

Sorbens: Der stark saure Kationenaustauscher Amberlite IR-120 wurde eine Stunde in Wasser quellen gelassen. Zur Aktivierung wurde das Harz mit 1n NaOH versetzt, 30 min am Magnetrührer gerührt, die überstehende Lauge abdekantiert und mit reichlich Wasser nachgewaschen. In gleicher Weise wurde mit 1n HCl behandelt. Die Aktivierung mit Säure und Lauge wurde ein zweites Mal wiederholt und der Austauscher anschließend in eine Säule geschlämmt. Durch Waschen mit Wasser bis zur neutralen Reaktion war die Austauschersäule gebrauchsfertig.

Elutionsmittel: Wasser zur Elution von Anionen und Neutralstoffen, 1n $NH_3$ zur Elution der basischen Bestandteile.

1.4. HPLC

Apparative Daten, allgemeine Arbeitsvorschriften s. II. 1.8., S. 118

Trennbedingungen für das "Alkaloidgemisch":

| | |
|---|---|
| Fließmittel: | Methanol-Wasser (30:70) |
| Durchfluß: | isokratisch 4 ml/min |
| Detektion: | 254 nm, range 0.1 |
| Einspritzmenge: | 20 µl einer 1%igen Lösung der Reinsubstanzen |

1.5. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte, UV-, IR- und MS-Spektren siehe II. 1.9.,S.119

1.6. Herstellen von Extrakten für pharmakologische Testungen

siehe II. 1.2., S. 111

2. Spezielle Arbeitsmethoden

2.1. "Alkaloide"

Gewinnung des Rohalkaloidgemisches

1 kg getrocknete und gepulverte Rindendroge wurde nach der

Soxhletextraktion mit n-Hexan mit 10% $Na_2CO_3$ angeteigt, unter IR-Licht getrocknet und mit 5 l Ethylacetat einer zweitägigen Perkolation unterworfen. Die Ausbeute von 3 g extrahierbaren Stoffen (0.3% des eingesetzten Materials) wurde in 2%iger Weinsäure (pH 2) aufgenommen und 5mal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Anschließend alkalisierten wir die wässrige Phase durch Zusatz von festem $Na_2CO_3$ bis zu einem pH von 8.5 und schüttelten die wässrige Phase solange mit Ethylacetat aus, bis die organische Phase keine positive Valser-Reaktion mehr zeigte. Die Rohalkaloidausbeute betrug 80 mg, das sind 0.008% der eingesetzten Droge.

Präparative Auftrennung des Alkaloidgemisches durch Schichtchromatographie

60 mg Rohalkaloidgemisch wurden auf 10 0.5 mm Kieselgelplatten durch dreimalige stufenförmige Entwicklung (5, 10, 15 cm) im LM II getrennt. Die vier im UV 254 nm dektierbaren Substanzzonen wurden mit Bleistift markiert, ausgeschabt und vom Kieselgel auf dem Magnetrührer durch 3malige 20 minütige Mazeration mit je 20 ml Ethylacetat-Methanol (1:1) eluiert. Nach dem Abdekantieren wurde membranfiltriert (Sartorius Typ SM, Porengröße 0.45µm).

Wir erhielten: A1: 5.5 mg
A2: 2.9 mg
A3: 7.5 mg
A4: 4.0 mg

Präparative HPLC

Die isolierten Verbindungen wurden unter den bei 1.4.,S.130, beschriebenen Bedingungen chromatographiert und die einzelnen Peaks aufgefangen. Der Methanolanteil der Fraktionen wurde im Vakuum abgezogen, das Wasser durch Gefriertrocknung entfernt.

Wir erhielten: A1: 2.2 mg
A2: 1.4 mg
A3: 3.3 mg
A4: 2.0 mg

## 2.2. Aminosäuren

Anreicherung der Aminosäuren nach VIRTANEN (225)

Der Drogenrückstand der Ethylacetatperkolation von 2.1. wurde mit 5 l 70% Methanol über 24 Stdn. perkoliert, wir erhielten 47 g extrahierbare Stoffe, das sind 4.7% des eingesetzten Drogenmaterials.

2 g des Methanolextraktes wurden mit etwas Polyamid angerieben, auf eine nach 1.2., S. 130, vorbereitete Polyamidsäule gegeben (Ø 6 cm, Länge 60 cm), mit Wasser bei einer Tropfgeschwindigkeit von 50 Tr./min eluiert und in Fraktionen zu 20 ml aufgefangen. Die ninhydrinpositiven Fraktionen (Tüpfelreaktion auf Papier) wurden vereinigt und gefriergetrocknet (Ausbeute 500 mg). Zur weiteren Anreicherung wurde die Aminosäurefraktion in wenig Wasser gelöst und auf eine nach 1.3., S. 130, vorbereitete kationische Amberlite-IR-120-Säule (Ø 1 cm, Länge 25 cm) gegeben. Mit Wasser lösten wir Anionen und Neutralstoffe von der Säule; sobald das Waschwasser farblos war, wurden die Aminosäuren mit 500 ml 1n $NH_3$ eluiert. Nach Einrotieren am Vakuum und Gefriertrocknung erhielten wir 15 mg hellbraunes Pulver.

Peptidhydrolyse mod. nach MOORE (196)

1.5 mg der Aminosäureanreicherung wurden mit 3 ml 6n HCl 24 Stdn. am Rückfluß erhitzt. Das Hydrolysat wurde im Vakuum über Phosphorpentoxid und festem Natriumhydroxyd getrocknet und der Rückstand in 2 ml Wasser aufgenommen.

Identifizierung der freien Aminosäuren

Die Identifizierung der freien Aminosäuren erfolgte mit Hilfe von Vergleichssubstanzen. Es wurde nacheinander in LM III und LM IV chromatographiert und mit Ninhydrin-Reagens detektiert.

| Aminosäure | $R_f$-Wert nach 2maliger Entwicklung |
|---|---|
| Phenylalanin | 0.70 |
| Tyrosin | 0.62 |
| Lysin | Start |

Identifizierung der Aminosäurezusammensetzung des Peptidhydrolysats

Das komplexe Aminosäuregemisch des Hydrolysats wurde zweidimensional in LM III und LM IV entwickelt. Die Detektion erfolgte mit Ninhydrin-Reagens.

| Aminosäure | $R_f$-Wert nach zweidimensionaler Trennung |
|---|---|
| Phenylalanin | 0.72 |
| Leucin/Isoleucin | 0.68 |
| Threonin | 0.46 |
| Alanin | 0.41 |
| Glutaminsäure | 0.36 |
| Glycin | 0.26 |
| Lysin | 0.16 |

## 2.3. Gerbstoffe

Formaldehyd-Salzsäure-Probe (185)

5 g eines wässrigen Gesamtextraktes der Rinde wurden in 50 ml Wasser aufgenommen und filtriert. Nach Zusatz von 5 ml HCl konz. und 10 ml 40% Formaldehydlösung wurde am Rückflußkühler 30 min zum Sieden erhitzt. Der dabei auftretende schwarzbraune Niederschlag zeigte die Anwesenheit von kondensierbaren Gerbstoffen an, die durch Formaldehyd und Salzsäure nahezu vollständig ausgefällt wurden. Nach dem Abkühlen filtrierte man und gab zu 10 ml des Filtrats 1 ml 1%ige Eisenalaun-Lösung und 5 g festes Natriumacetat zu. Die dabei zu beobachtende Blau-Violett-Färbung war auf die Anwesenheit von hydrolysierbaren Gerbstoffen zurückzuführen.

Isolierung der Catechine

100 g der gepulverten Droge wurde mit 1 l Methanol 5 Stdn. am Magnetrührer mazeriert, das Filtrat eingeengt (Ausbeute 3.2 g, entsprechend 3.2% des eingesetzten Materials) und 3mal mit je 200 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase ergab nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels 800 mg hellbraunes Pulver.

700 mg wurden auf eine nach 1.3., S. 129, vorbereitete Kieselgelsäule gegeben (Ø 2.5 cm, Länge 27.5 cm) und bei einer Tropfgeschwindigkeit von 40 Tr/min einer Ether-Aceton-Gradient-Elution unterworfen. Die chromatographische Trennung wurde durch die Vanillin-Salzsäure-Probe verfolgt:

| | | Vanillin/HCl |
|---|---|---|
| Ether | 300 ml | - |
| Ether-Aceton (9:1) | 300 ml | - |
| Ether-Aceton (8:2) | 200 ml | (+) |
| Ether-Aceton (7:3) | 100 ml | ++ |

Die Catechin-Anreicherung (180 mg) wurde durch präparative Schichtchromatographie auf 0.5mm Kieselgelplatten weiter aufgetrennt. Die Entwicklung erfolgte zunächst bis zu einer Laufhöhe von 5 cm im LM nach BITTNER und anschließend bis zu einer Laufhöhe von 10 cm im LM V.
Die Trennung von Catechin und Epigallocatechingallat gelang erst nach dreimaliger stufenförmiger Entwicklung im LM V auf 0.25 mm Kieselgelplatten. Die Präparation der Substanzbanden erfolgte nach der unter 2.1., S. 131, beschriebenen Methode. Da die isolierten Substanzen bis auf Epicatechingallat und Epigallocatechingallat beim Einrotieren eine braune schmierige Konsistenz annahmen, wurden sie zur Kristallisation in Wasser aufgenommen. Um Polymerisation zu vermeiden, durfte nur geringfügig bis zur beginnenden Braunfärbung der Lösung erwärmt werden. Aus den wässrigen Lösungen kristallisierten die Substanzen in Form kleiner weißer Nädelchen, die schnell über Phosphorpentoxid unter Stickstoffatmosphöre getrocknet wurden. An der Luft erfolgte dann wieder leichte Braunfärbung.

| | | |
|---|---|---|
| Wir erhielten: | (+)-Catechin: | 47.0 mg |
| | (-)-Epicatechin: | 14.0 mg |
| | (+)-Gallocatechin: | 8.0 mg |
| | (-)-Epigallocatechin: | 4.5 mg |
| | (-)-Epicatechingallat: | 1.5 mg |
| | (-)-Epigallocatechingallat: | 1.1 mg |

Mikrohydrolyse der Gallussäureester

0.5 mg Substanz wurden in einer 5 ml Glasampulle in 2 ml 2%iger HCl aufgenommen. Nach dem Zuschmelzen der Ampulle wurde 24 Stdn. bei 100°C hydrolysiert. Das Hydrolysat trockneten wir im Vakuum über Phosphorpentoxid und Natriumhydroxyd und nahmen den Rückstand in einigen Tropfen Methanol p.a. auf.
Nach Entwicklung in LM V ließ sich Gallussäure mit einem $R_f$-Wert von 0.7 nachweisen, daneben hatten sich aber vier neue Verbindungen gebildet, die sich alle im unteren $R_f$-Bereich befanden und damit keiner der bisher isolierten Verbindungen zuzuordnen war. Literaturangaben (226) zufolge zeigen u.a. Epicatechingallat und Epigallocatechingallat dieses Verhalten. Durch $R_f$- und Schmelzpunktvergleich konnten die isolierten Verbindungen identifiziert werden.

Säurehydrolyse der kondensierten Tannine

500 mg der Tannine, die bei Einengung des Methanolextraktes ausgefallen waren, wurden in 30 ml Wasser aufgenommen und 3mal mit je 20 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet, in 5 ml Wasser aufgeschlämmt, und nach Zusatz von 20 ml HCl konz. 2 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde 30 ml 20%ige Natriumcarbonat-Lösung zugesetzt und 3mal mit je 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Ausbeute an hydrolysierten niedermolekularen Bestandteilen: 380 mg.

Isolierung von Gallussäure und Protocatechusäure

50 mg des Tanninhydrolysats wurden auf 0.5 mm Kieselgelplatten aufgetragen, im LM VI einmal bis zu einer Laufhöhe von 10 cm entwickelt und nach der unter 2.1., S. 131, beschriebenen Methode isoliert. Aus Wasser kristallisierten beide Substanzen in Form langer weißer Nadeln, die über Phosphorpentoxid im Vakuumexsiccator getrocknet wurden.
Gallussäure: 16.8 mg, Smp. 237°C (Z)
Protocatechusäure: 4.3 mg, Smp. 185° - 191°C

## 2.4. Sterine und Sterinester

### Isolierung von Stigmasterin und β-Sitosterin

Aus 1 kg gepulverter Stammrinde wurde nach 4tägiger Soxhlet-Extraktion mit n-Hexan 5.6 g hellbrauner öliger Extrakt gewonnen.

500 mg dieses Extraktes wurden auf 10 0.5 mm Kieselgelplatten im LM IX zweimal stufenförmig entwickelt. Die Hauptsubstanz im $R_f$-Bereich von 0.7 wurde nach der unter 2.1., S. 131, beschriebenen Methode isoliert und mit Dichlormethan-Methanol (2:1) vom Kiesegel eluiert. 41 mg der Verbindung kristallisierten aus Chloroform-Ethanol (1:9) als weiße schüppenförmige Plättchen. Der Mischschmelzpunkt mit β-Sitosterin ergab allerdings eine Depression. Das Auftreten zweier MS-Peaks bei $M^+$ 414 und $M^+$ 412 zeigte ein Gemisch von zwei Substanzen an.

5 mg des Substanzgemisches wurden auf die oben beschriebene Weise über 7 HPTLC-Platten in zwei dicht übereinander liegende Zonen getrennt. Die beiden isolierten Verbindungen kristallisierten leicht aus absolutem Ethanol.

| | | |
|---|---|---|
| Zone 1: | Stigmasterin | 1.3 mg |
| Zone 2: | β-Sitosterin | 1.1 mg |

### Isolierung der Acetate von β-Sitosterin und Stigmasterin

Zur Anreicherung der Sterinester und Lipide aus dem n-Hexan-Auszug wurden 70 mg auf eine mit Kieselgel 60 Merck (0.063-0.200) gefüllte Säule (Ø 2.5 cm, Länge 25 cm) aufgetragen und bei einer Tropfgeschwindigkeit von 20 Tr./min einer Petrolether-Ether-Gradienten-Elution unterworfen. Vor der Fraktionierung wurde die Säule mit 1 l Petrolether-Ether (1:1) gespült.

| | | |
|---|---|---|
| Petrolether-Ether (9:1) | 200 ml | Lipide |
| Petrolether-Ether (8:2) | 300 ml | Lipide |
| Petrolether-Ether (5:5) | 400 ml | Lipide, Sterinacetate |
| Ether | 300 ml | Sterine |

Die Lipid-Stearinacetat-Fraktion wurde eingeengt (Ausbeute 11 mg) und auf 0.25 mm Kieselgelplatten in LM X einmal bis zu einer Laufhöhe von 10 cm entwickelt. Die Hauptzone bei $R_f$ 0.80 wurde isoliert (siehe 2.1., S. 131), als Eluens vom Kieselgel diente Dichlormethan-Ethanol (1:1). Ausbeute 2 mg. Die Kristallisation erfolgte aus absolutem Ethanol. Im MS wurden zwei Massenpeaks mit $M^+$ 456 und $M^+$ 454 erhalten, die beiden Massen entsprechen den Molekulargewichten der Acetate von β-Sitosterin und Stigmasterin.

## IV. Pharmakologische Untersuchungen

### 1. Granulozytentest modifiziert nach BRANDT (82,83)

#### 1.1. Testdurchführung

Herstellung der Granulozytensuspension

15 ml heparinisiertes Venenblut klinisch gesunder Erwachsener wurde mit 1.5% Dextran T 500 (Pharmacia) 2:1 verdünnt und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der leukozytenhaltige Überstand wurde in ein steriles Plastikröhrchen überspritzt und 7 min bei 500 U min zentrifugiert.
Die Granulozyten im Bodensatz wurden zweimal mit je 5 ml RPM I-Puffer gewaschen. Anschließend suspendierte man die Granulozyten in ca. 5 ml Puffer und stellte in der Neubauerkammer auf eine Konzentration von $5 \times 10^6$ Zellen/ml ein.

Herstellung der Hefesuspension

In 0.9% NaCl suspendierte Bäckerhefe wurde auf 100°C erhitzt, dreimal durch Gaze filtriert und auf $3 - 5 \times 10^7$ Partikel/ml eingestellt.

Herstellung des Poolserums

Das Serum 5 klinisch gesunder Erwachsener wurde gemischt und in Portionen von 5 ml eingefroren. Zum Test verdünnte man mit 0.9% NaCl 1:10.

Durchführung des Tests:

Zu jeweils 0.2 ml Poolserum, Granulozyten- und Hefesuspension wurden 0.2 ml in 0.9% NaCl gelöste Substanz bzw. 0.2 ml 0.9% NaCl als Kontrolle pipettiert und zunächst bei 37°C 10 min inkubiert. Danach brachte man jeweils 0.5 ml eines Ansatzes auf einen Objektträger und inkubierte weitere 35 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Dabei setzten sich die Granulozyten ab, der Überstand wurde vorsichtig mit 0.9% NaCl abgespült und die Objektträger mit einem Fön getrocknet.

Anfärbung:

1) 5 min May-Grünwald-Lösung (Merck), filtriert, unverdünnt
2) 2 min Aqua dest.
3) 15 min Giemsa-Lösung (Merck), 5 ml in 180 ml $H_2O$
4) 4 min Aqua dest.

Lufttrocknen lassen

Auswertung:

Pro Objektträger wurden 100 Granulozyten ausgezählt und bestimmt, wieviele Hefepartikel von den einzelnen Zellen phagozytiert wurden. Der Phagozytoseindex (PJ) gibt die durchschnittliche Anzahl von Hefepartikeln pro Granulozyt an. Die Steigerung (S) der Phagozytoseaktivität im Vergleich zum Blindwert wurde berechnet nach:

$$S = \frac{PJ_{Substanz} - PJ_{Kontrolle}}{PJ_{Kontrolle}} \times 100\ (\%)$$

## 1.2. Berechnung des relativen Variationskoeffizienten $V_r$ (%)

Verwendetes Material

1. EtOH-Extrakt von Uncaria tomentosa $10^{-3}$%
2. angereicherte Alkaloidfraktion aus Unc.tom. $10^{-2}$%
3. angereicherte Alkaloidfraktion aus Unc.tom. $10^{-2}$%
4. Reinsubstanz Aristolochiasäure $10^{-8}$%, versch.Teste
5. Reinsubstanz Aristolochiasäure $10^{-9}$%, versch.Teste
6. Reinsubstanz Emetin $10^{-6}$%, innerhalb eines Tests

| Test | n | $\sqrt{n}$ | $\bar{x}$ | s | $V_r$ (%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | 2.00 | 27.00 (12.0) | 7.53 | 14.0 | |
| 2 | 3 | 1.73 | 30.67 (10.0) | 4.04 | 7.6 | $\bar{x}$ = 13.6 |
| 3 | 3 | 1.73 | 28.87 (24.4) | 9.79 | 19.6 | |
| 4 | 3 | 1.73 | 28.33 ( 7.3) | 2.96 | 6.0 | $\bar{x}$ = 7.04 |
| 5 | 4 | 2.00 | 26.83 ( 6.9) | 4.34 | 8.1 | |
| 6 | 7 | 2.65 | 15.77 ( 2.8) | 3.02 | 7.2 | |

Die Werte in Klammern stellen den Vertrauensbereich des Mittelwertes bei P = 95% dar.

## 2. Chemilumineszenz-Test

### 2.1. Geräte

CL-Messung: Biolumat LB 9505, Fa.Berthold, Wildbad
Computer und Diskettenlaufwerk: Apple IIe, Fa.Apple
Programm: Fa.Berthold
Display: DM 5112 CX, Fa.Sanyo
Printer/Plotter: Epson RX-80

### 2.2. Testdurchführung

Herstellen der Lösungen:

a) Steriler PBS-Puffer ohne $Ca^{2+}/Mg^{2+}$, fertig erhältlich bei Fa.Biochrom, Berlin

b) Veronal-gepufferte Kochsalz-Lösung mit $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, Glucose und Albumin:

Stammlösung: 8.3 g NaCl, 1.02 g Veronal, 102 mg $MgCl_2$ und 22 mg $CaCl_2$ wurden in 150 ml $H_2O$ gelöst. Nach Zugabe von 3.5 ml 1 m HCl wurde auf 200 ml mit $H_2O$ aufgefüllt.

Testlösung: 40 ml der Stammlösung wurden mit 140 ml $H_2O$ verdünnt, mit 1 m HCl auf pH 7.0 eingestellt und mit $H_2O$ auf 200 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 mg reinem Rinder-Serumalbumin (Fa.Boehringer) und 200 mg Glucose wurde die Lösung sterilfiltriert.

c) Lucigenin-Lösung:
Stammlösung: 25.5 mg Lucigenin wurden in 10 ml $H_2O$ gelöst.
Testlösung: Die Stammlösung wurde im Verhältnis 1:5 mit $H_2O$ verdünnt.

d) Opsoniertes Zymosan:
Vorratssuspension: Man suspendierte 25 mg Zymosan in 10 ml 0.9% NaCl und erhitzte 90 min im Wasserbad. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension in 2 ml-Portionen aufgeteilt und eingefroren.
Testlösung: 2 ml Vorratssuspension wurden mit 2 ml Serum klinisch gesunder Erwachsener 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert und mit 0.9% NaCl gewaschen. Das nun opsonierte Zymosan wurde in 2 ml 0.9% NaCl suspendiert.

Als "Wasser" wurde in jedem Falle Aqua bidest. verwendet.

Verdünnung des Vollbluts

20 ml Nativblut wurden mit 30 mg EDTA als Gerinnungshemmer versetzt und 1:100 mit PBS-Puffer verdünnt.

Gewinnung der Polymorphkernigen Leukozyten (PMNL)

20 ml Nativblut wurden mit 30 mg EDTA versetzt. 15 ml dieses Blutes mischte man mit 7 ml Dextran in einer Spritze und ließ 30 min bei Raumtemperatur stehen. Der leukozytenhaltige Überstand wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Niederschlag bestand aus Leukozyten und Restanteilen von Erythrozyten, die durch ihren Farbquench die Messung beeinflussen können. Durch hypotone Lyse wurden die restlichen Erythrozyten entfernt. Dazu wurde der Niederschlag in 0.2% NaCl-Lösung suspendiert und 20 sec auf dem Whirlimix geschüttelt. Dann wurden 20 ml 1.6%-ige NaCl-Lösung zugegeben und nochmals geschüttelt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 2000 U/min saugte man den Überstand ab und wiederholte den gesamten Vorgang noch zweimal. Anschließend wurde der Niederschlag in 2 ml PBS-Puffer suspendiert und 1:10 mit Türcks-Lösung verdünnt. In der Neubauerkammer wurde mit PBS-Puffer auf $10^6$-Zellen/ml eingestellt.

Durchführung des Tests

a) Vollblut: 460 µl Veronal-gepufferte Kochsalzlösung
200 µl verdünntes Vollblut
100 µl Lucigenin-Lösung
200 µl in PBS gelöste Substanz bzw. PBS als Kontrolle

b) PMNL: 630 µl Veronal-gepufferte Kochsalzlösung
15 µl PMNL
100 µl Lucigenin-Lösung
200 µl in PBS gelöste Substanz bzw. PBS als Kontrolle

Nach 10minütiger Vorinkubation bei Raumtemperatur und anschließender 10minütiger Inkubation bei 37°C im 6-Kanal-Biolumat (Fa.Beckman) wurde 40 µl opsoniertes Zymosan unter kräftigem Umrühren zugegeben und die Messung gestartet. Meßende war meistens nach 60 min.

Auswertung der Testergebnisse

Die CL-Antwort der Proben wurde über den Meßzeitraum von einem Computer gespeichert und nach Beendigung der Messung in Form einer Kurve dargestellt. Durch Integration der Fläche erhält man die Intensität der CL-Antwort der betreffenden Probe in cpm.

Die Steigerung S der CL-Antwort durch eine Testsubstanz wurde nach

$$S = \frac{cpm_{Substanz} - cpm_{Kontrolle}}{cpm_{Kontrolle}} \times 100\ (\%)$$

berechnet.

## 2.3. Berechnung des relativen Variationskoeffizienten $V_r$ (%)

Zur Berechnung des relativen Variationskoeffizienten wurde das Na-Salz der Aristolochiasäure verwendet.

a) Vollblut

| | n | $\sqrt{n}$ | $\bar{x}$ | s | $V_r$ (%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $10^{-2}$% | 3 | 1.73 | 0.66 (0.7) | 0.28 | 24.6 | |
| $10^{-3}$% | 3 | 1.73 | 1.52 (0.9) | 0.34 | 13.9 | |
| $10^{-4}$% | 4 | 2.00 | 1.20 (0.3) | 0.19 | 7.9 | $\bar{x}$ = 15.84% |
| $10^{-5}$% | 3 | 1.73 | 1.16 (0.8) | 0.34 | 16.9 | |
| $10^{-6}$% | 3 | 1.73 | 1.09 (0.7) | 0.30 | 15.9 | |

Die Werte in Klammern geben jeweils den Vertrauensbereich des Mittelwertes bei P = 95% an.

b) PMNL

| | n | $\sqrt{n}$ | $\bar{x}$ | s | $V_r$ (%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $10^{-6}$% | 3 | 1.73 | 68.3 (22.6) | 9.09 | 7.7 | $\bar{x}$ = 7.55% |
| $10^{-7}$% | 3 | 1.73 | 61.9 (18.4) | 7.99 | 7.4 | |

Die Werte in Klammern geben jeweils den Vertrauensbereich des Mittelwertes bei P = 95% an.

3. Carbon-Clearance-Test nach BIOZZI (94,95)

Versuchstiere: weibliche NMRI-Mäuse, 25 - 30 g
Kollektivgröße: für Screening-Untersuchungen 3 Tiere, sonst 5 Tiere pro Substanz, 2 Tiere für Kontrolle
Haltung und Fütterung: bei 20° - 22°C in Makrolonkäfigen, SFI-Standardfutter, Wasser ad libitum
Behandlungsmodus: Die in 0.9% NaCl gelöste Substanz wurde ein- oder mehrmals i.p. gegeben. Die Lösung sollte membranfiltriert sein, um eine Eigenstimulation durch feine Suspensionen zu vermeiden. Intraperitoneale Gabe von groben Suspensionen führt zum Tod der Tiere.
Die Einzeldosis betrug normalerweise zwischen 0.1 und 10 mg/kg Körpergewicht. Die letzte Gabe erfolgte 24 Stdn. vor Testbeginn.

Testdurchführung: Eine Tuschesuspension mit einem 10%igem Gehalt an Gasruß (Teilchengröße 200 - 250 Å, Fa.Günther Wagner, Hannover) wurde mit 1%iger Gelatine in 0.9% NaCl auf 16 mg Kohle pro ml eingestellt und auf 37°C vorgewärmt. Jede Maus erhielt 0.1 ml/10 g in die Schwanzvene injiziert. Nach t = 3, 6, 9, 12, 15 min wurden durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus 25 µl Blut entnommen (heparinisierte Einmal-Mikro-Pipetten). Das Blut wurde in 2 ml Aqua dest. hämolysiert und die Kohlekonzentration bei $\lambda$ = 650 nm photometrisch bestimmt (Hitachi-Spectrometer 181, Küvettendicke 1 cm).

Auswertung: Für die exponentiell verlaufende Kohleelimination wurde der Regressionskoeffizient K rechnerisch ermittelt (Log E gegen t, Rechner: Texas Instruments TI-55-II). Durch Bildung des Quotienten $K_{Subst.}/K_{Kontrolle}$ konnte auf die Stimulierung oder Suppression des RES geschlossen werden.

## 4. $^3$H-Thymidin-Einbautest an Asciteszellen zur Prüfung auf Cytotoxizität (98)

### 4.1. Testdurchführung

3 ml Zellsuspension von Walker-250-Carcinosarkom-Ascites wurden in einem 50 ml Zentrifugenglas mit 10 ml MEDIUM L-15 (Boehringer) versetzt und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zentrifugenglas bis 1 cm unter den Rand mit Medium aufgefüllt. Aus der gerührten Zellsuspension gab man je Probe 1 ml (entsprechend 2 x $10^6$ Zellen/ml) in ein Zentrifugenglas und fügte 500 µl der Probelösung hinzu, der Kontrollversuch erfolgte mit 500 µl Medium. Jeder Versuch wurde 4 - 6mal durchgeführt. Nach einer zweistündigen Vorinkubation bei 37°C wurde pro Probe 100 µl $^3$H-Thymidin (spez. Akt. 50 Ci/mM) zugegeben und eine weitere Stunde unter Schüt-

teln inkubiert. Danach wurde der Einbau durch Zugabe von 1.5 ml 1N-Perchlorsäure pro Probe gestoppt und der Ansatz über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die Niederschläge, die die eingebauten Präkursoren enthielten, wurden durch ein mit Perchlorsäure befeuchtetes Filterpapier abgesaugt, mit 5%iger Trichloressigsäure und anschließend mit Ethanol gewaschen. Die Filter wurden in Polyethylenfläschchen gebracht und die Aktivitäten im Toluol-Scintillator gemessen. Die Ergebnisse wurden mit der Kontrolle verglichen und die Hemmeffekte in Prozent ausgedrückt.

## 4.2. Relativierung der Testergebnisse

Da die prozentuale Einbauhemmung bei gleichen Substanzen Schwankungen bis zu 30% zwischen einzelnen Versuchen zeigte, wurde Methotrexat $^{R}$, welches als Folsäureantagonist die DNA-Synthese hemmt, als Bezugssubstanz in jeder Versuchsreihe mitgetestet. Der Mittelwert der Methotrexat $^{R}$-Hemmung (43% bei 2 mg/ml) wurde zur Ermittlung der relativen Hemmung H der Substanzen herangezogen:

$$H_{Subst.} = \frac{H_{Subst.Test}}{H_{Meth.Test}} \times H_{Meth.Mittelwert\ (\%)}$$

## 5. Akute Toxizität

Versuchstiere: weibliche oder männliche NMRI-Mäuse, 30 - 35 g
Haltung und Fütterung: bei 20° - 22°C in Makrolonkäfigen, SFI-Standardfutter, Wasser ad libitum
Kollektivgröße: 5 Mäuse
Testdurchführung: Die Mäuse erhielten in $H_2O$ oder 0.9%iger NaCl-Lösung gelösten Testsubstanzen p.o. mittels einer Schlundsonde oder i.p. appliziert. Man beobachtete das Verhalten gegenüber einer Kontrollgruppe über 14 Tage.

## 6. Mikrobiologische Untersuchungen

Die mikrobiologischen Untersuchungen wurden unter Anleitung von Prof.Dr.A.Bauernfeind am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität München durchgeführt.

### 6.1. Durchführung des Agardilutionstests zur Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (127)

Vorbereitung des Agars:
Das Grund-Medium (Müller-Hinton-Fertigmedium, Difco-Laboratories, pH 7.5 bei 25°C) wurde mit 38 g/l in destilliertem Wasser suspendiert und auf 55° - 60°C erwärmt. Aus einer Substanz-Stammlösung (Testsubstanz in 0.9% NaCl) pipettierte man dem Grundmedium soviel Flüssigkeit zu, daß die gewünschte Endkonzentration an Testsubstanz im Agar erreicht wurde. Die Konzentration der einzelnen Substanzen wurde auf 0.25-1-4-16-64-254-1024 µg/ml Agar festgelegt. Die verschieden konzentrierten Agar-Substanz-Gemische goß man in Petrischalen und ließ über Nacht stehen.

Vorbereitung und Auftragen der Bakterienstämme:
Die Bakterienstämme (Max von Petterkofer-Institut der Universität München), die sich in der log-Wachstumsphase befanden, wurden in 0.9% NaCl suspendiert und durch Trübungsmessung am Photometer bei $\lambda = 600$ nm so eingestellt, daß sich nach dem Auftragen in jeder Kolonie $10^4$ vermehrungsfähige Keime befanden. Die Stämme wurden in Mikrotiterplatten überführt und mit Hilfe eines Multi-Point-Inokulators auf die vorbereiteten Petrischalen übertragen.

Bebrütung: 16 Stdn. bei 37°C

Auswertung:

| | |
|---|---|
| Kontrolle | + |
| leicht abgeschwächtes Wachstum | +/-: positiv |
| Einzelkolonien oder Schatten | -/+: negativ |
| kein Wachstum | - |

Die minimale Hemmkonzentration einer Substanz ist die niedrigste Konzentration ohne Wachstum, also - oder -/+.

## 6.2. Untersuchte Substanzen

a) wässriges Mazerat von Okoubaka aubrevillei
b) "Rohalkaloidgemisch" aus Okoubaka aubrevillei
c) Modellgemisch aus gleichen Teilen kondensierten und hydrolysierbaren Gerbstoffen (wässrige Mazerate von Catechu und Galläpfeln)

## 6.3. Verwendete Teststämme

a) grampositive Bakterien

Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus warneri, Staphylococcus hominis, Staphylococcus saprophyticus, Streptococcus faecalis, Streptococcus faecium

b) gramnegative Bakterien

Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Enterobacter sakazakii, Enterobacter agglomerans, Citrobacter freundii, Citrobacter diversus, Serratia marcescens, Serratia liquefaciens, Hafnia alvei, Aceinetobacter calcoaceticus, Providencia rettgeri, Providencia stuartii, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Morganella morganii, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Pseudomonas cepacia, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas maltophilia, Salmonella typhimurium, Salmonella agona, Salmonella enteritidis, Salmonella brandenburg.

## A N H A N G

### Statistische Definitionen

$x_i$: Meßwert

n: Anzahl der Meßwerte

$\bar{x}$: arithmetischer Mittelwert aller Meßwerte

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} \cdot (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$ : Varianz mit (n-1) Gewichtung

$$s = \sqrt{s^2}$$ : Standardabweichung

$$V_r = \frac{s}{\bar{x} \cdot \sqrt{n}} \times 100\ (\%)$$: relativer Variationskoeffizient

Vertrauensbereich des wahren Mittelwertes $\mu$:

$$\bar{x} - \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$$

t = tabellierter Wert in Abhängigkeit von den Freiheitsgraden n-1 der Stichprobe bei verschiedenen Irrtumsrisiken mit P = 95% und P = 99% Wahrscheinlichkeit

### Prozentangaben

Die Prozentangaben bei den pharmakologischen Testen sind g/100 ml.

## L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S


1) S.MOESCHLIN: Therapiewoche 19, 748 (1969)
2) T.MAKINODAN, G.W.SANTOS und R.QUINN: Pharmacol.Rev. 22, 189 (1970)
3) D.RICKEN und K.SCHUMACHER: "Medikamentöse Immunsuppression", Georg Thieme-Verlage, Stuttgart (1971)
4) V.E.PHILLIPSBORN: Fortschr.Med. 18, 687 (1964)
5) J.F.LAUCIUS, A.J.BODURTHA, M.J.MASTRANGELO und R.H.CREECH: J.Reticul.Soc. 16, 347 (1974)
6) H.G.SCHWICK: Dtsch.Apoth.Ztg. 116, 1119 (1976)
7) L.MILAS und M.T.SCOTT: Adv.Canc.Res. 26, 257 (1978)
8) A.MAYR, H.RAETTIG, H.STICKL und M.ALEXANDER: Fortschr.Med. 97, 1205 (1979)
9) R.HÄNSEL: Z.angew.Phytother. 5, 172 (1981)
10) M.TÜRCK und J.E.SCHULZ: Pharmazie in unserer Zeit 10, 33 (1981)
11) A.MAYR: in "Organo- und Immunotherapie als neue Denkweise in der Medizin", Hrsg. K.Theurer, G.F.Domagk und H. Kraft, S. 3, Enke-Verlag, Stuttgart (1982)
12) H.WAGNER: Z.Allg.Med. 59, 1282 (1983)
13) J.DREWS: Swiss Pharma 2, 49 (1980)
14) A.MAYR, H.RAETTIG, H.STICKL und M.ALEXANDER: Fortschr.Med. 25/26, 1159 (1979)
15) H.Z.MOVAT und M.V.P.FERNANDO: Exp.Mol.Pathol. 4, 155 (1965)
16) I.I.BREKHMAN und I.V.DARDYMOV: Lloydia 32, 46 (1969)
17) M.BELKIN, W.G.HARDY, A.PERRAULT und H.SATO: Cancer Res. 19, 1050 (1959)
18) R.L.WHISTLER, A.A.BUSHWAY, P.P.SINGH, W.NAKAHARA und R.TOKUZEN: Adv.Carbohydr.Chem.Biochem. 32, 235 (1976)
19) H.WAGNER und A.PROKSCH in "Progress in medical and economic Plant research", Vol. I, Hrsg. N.Farnsworth, H.Hikino and H.Wagner, Academic press, New York, in Druck
20) H.WAGNER, A.PROKSCH, I.RIESS-MAURER, Y.H.HEUR, K.JURCIC, M.LE TURDU, S.ODENTHAL, H.STUPPNER und A.VOLLMAR: Arzneim.-Forsch., in Druck
21) WHO, Tech.Rep.Ser.No. 595, 1 (1976)
22) J.KRALOVEC: Drugs of the future 8, 615 (1983)
23) HAGER's Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Hrsg. P.List und L.Hörhammer, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1975)
24) J.R.MÖSE und G.LUKAS: Arzneim.-Forsch. 11, 33 (1961)
25) J.R.MÖSE: Planta med. 11, 72 (1963)
26) W.SCHUNACK, E.MUTSCHLER und H.ROCHELMEYER: Pharmazie 20, 685 (1965)
27) W.SCHUNACK, E.MUTSCHLER und H.ROCHELMEYER: Pharmazie 22, 118 (1967)
28) W.SCHUNACK, E.MUTSCHLER und H.ROCHELMEYER: Arzneim.-Forsch. 17, 1215 (1967)
29) K.NORPOTH und H.D.DEPPE: Z.Hyg. 151, 55 (1965)
30) N.KOMATSU, H.NAWATA und T.KIMINO: Showa Igakkai Zasshi 33, 776 (1973)
31) H.DENK, M.ROTTER und G.WIEDERMANN:Z.Immunit.Forsch.,Allergie u.Klin.Immunol.131, 317 (1966)

32) H.BARTFELD: Arzneim.-Forsch. 27, 2297 (1977)
33) M.ROTTER, H.DENK und G.WIEDERMANN: Wi.kli.Wo. 79, 35 (1967)
34) S.BATSFORD, R.KLUTHE und A.VOGT: Planta med. 39, 234 (1980)
35) J.R.MÖSE: Arzneim.-Forsch. 16, 118 (1966)
36) H.SIERING und K.ABENDROTH: Naturwissenschaften 42, 541 (1967)
37) G.WIEDERMANN, H.DENK und M.ROTTER: Z.Immunit.Forsch.,Allergie u.Klin.Immunol. 135, 481 (1968)
38) H.SIERING und H.-J.MÜLLER: Arzneim.-Forsch. 31, 1260 (1981)
39) Y.TAGASHIRA, R.FUJIWARA und M.ONO: Gan to Kagaku Ryoho 8, 234 (1981), Ref.C.A. 95, 73702 (1981)
40) M.MORI, S.NAKAMOTO, Y.ARASHIMA und S.SENO: Gan to Kagaku Ryoho 6, 175 (1979), Ref.C.A. 90, 197551 (1979)
41) P.G.XAI: J.Ethnopharmakol. 7, 95 (1983)
42) V.BÄHR und R.HÄNSEL: Arch.Pharm. 313, 653 (1980)
43) L.A.BOXER, J.M.ALLEN und R.L.BAEHNER: J.Lab.Clin.Med. 92, 730 (1978)
44) L.N.XU, J.R.OUYANG, Z.Z.YIN, L.Y.ZHANG und L.X.JI: Yaoxue Xuebao 16, 411 (1981), Ref.C.A. 97, 16815 (1982)
45) H.UMEZAWA, T.TAKEUCHI, T.AOYAGI und M.ISHIZUKA: J.Antibiot. 30, 153 (1977)
46) H.UMEZAWA: Biotechnol.Bioeng. 22, Suppl.,99 (1980)
47) M.C.KE, S.N.WANG, Y.C.YAO und C.F.LIN: Hu-Nan I Hsueh Yuan Hsueh Pao 5, 277 (1980), Ref.C.A. 94, 109240 (1981)
48) R.R.RAV und R.R.NAIR: Pharmacology 4, 347 (1970)
49) M.KUBO, K.NUMBA, N.NAGAMOTO, T.NAGAO, J.NAKANISHI, H.UNO und H.NISHIMURA: Planta med. 47, 52 (1983)
50) V.S.BYERS, W.B.EPSTEIN, N.CASTAGNOLI und H.BAER: J.Clin.Invest. 64, 1437 (1979)
51) J.TANAKA, H.FUJIWARA und M.TORISU: Immunology 38, 727 (1979)
52) T.YASUNAGA, K.HITOSHI, K.OHGAKI, T.INAMOTO und Y.HIKASA: J.Nutr. 112, 1075 (1982)
53) R.H.HEINZERLING, C.F.NOCKELS, C.L.QUARLES und R.P.TENGERDY: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 146, 279 (1974)
54) L.H.BLOCK, A.GEORGOPOULOS, P.MAYER und J.DREWS: J.Exp.Med. 148, 1228 (1978)
55) P.MAYER, H.HAMBERGER und J.DREWS: Infection 8, 256 (1980)
56) I.KUBO, T.KAMIKAWA und I.MIURA: Tetrahedron Letters 24, 3825 (1983)
57) R.VALDES und F.CORDOBA: Agents and Actions 5, 64 (1975)
58) W.GRIMM, E.BÄRLIN, H.G.LESER, W.KRAMER und D.GEMSA: Clin. Immun.Immunpath. 17, 617 (1980)
59) J.ABB, G.J.BAYLISS und F.DEINHARDT: J.Immunol. 122, 1639 (1979)
60) G.PALU: Acta Bio. Med. 52, 145 (1981)
61) J.D.VASSALLI, J.HAMILTON und E.REICH: Cell 11, 695 (1977)
62) K.BRUNE, H.KALIN, R.SCHMIDT und E.HECKER: Cancer Lett. 4, 333 (1978)
63) A.M.MASTRO, T.A.KRUPA und P.SMITH: Cancer Res. 39, 4078 (1979)
64) J.LUTOMSKI und N.T.NHAM: Herba Polon. 23, 5 (1977)
65) Zenyaku Kogyo Co Ltd., Jpn.Kokai Tokkyo Koho 80 167.300, Ref.C.A. 94, 214604 (1981)
66) Rote Liste 1983: "Verzeichnis der zugelassenen Fertigarzneimittel der BRD", Hrsg. Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie, Edito Cantor, Aulendorf (1983)

67) A.v.FELLENBERG-ZIEGLER: "Homöopathische Arzneimittel", Haug-Verlag (1982)
68) H.A.HOPPE: "Drogenkunde", Bd. 1, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin-New York (1975)
69) L.S.KUCERA und E.C.HERRMANN: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 124, 865 (1967)
70) G.MAY und G.WILLUHN: Arzneim.-Forsch. 28, 1 (1978)
71) A.WACKER und H.-G.EILMES: Arzneim.-Forsch. 28, 347 (1978)
72) D.A.VAN DEN BERGHE, M.IEVEN, F.MERTENS und A.J.VLIETINCK: Lloydia 41, 463 (1978)
73) M.IEVEN, D.A.VAN DEN BERGHE und A.J.VLIETINCK: Planta med. 36, 254 (1979)
74) O.P.BARBAR, S.K.BAJPAI und B.L.CHOWDHURY: Indian J.Experim. Biolog. 17, 451 (1979)
75) A.G.SUGANDA, M.AMOROS und L.GIRRE: J.Nat.Prod. 46, 626 (1983)
76) P.S.MORAHAN und A.M.KAPLAN: Int.J.Cancer 17, 82 (1976)
77) D.GAAL und A.NOWOTNY: Cancer Immunol.Immunother. 6, 9 (1979)
78) M.GOTO, A.MITSUOKA, M.SUGIYAMA und M.KITANO: J.Exp.Med. 154, 204 (1981)
79) E.M.HERSH: "Augumenting Agents in Cancer Therapy", Raven press, New York (1981)
80) F.J.DI CARLO, L.J.HAYNES, N.J.SLIVER und G.E.PHILLIPS: J.Recticul.Soc. 1, 224 (1964)
81) P.DELAVEAU, P.LALLOQUETTE und A.M.TESSIER: Planta med. 40, 49 (1980)
82) L.BRANDT: Scand.J.Haematol., Suppl. 2 (1967)
83) K.D.TYMPNER: Münch.Med.Wschr. 8, 251 (1978)
84) R.C.ALLEN, R.L.STJERNHOLM und R.H.STEELE: Biochem.Biophys. Res.Commun. 47, 129 (1972)
85) R.D.NELSON, E.L.MILLS, R.L.SIMMONS und R.G.QUIE: Infect. Immun. 14, 129 (1976)
86) M.J.WEIDEMANN, B.A.PESKAR und K.WROGEMANN: FEBS Letters 89, 136 (1978)
87) B.M.BABIOR: N.Engl.J.Med. 298, 659 (1978), ibid. 721 (1978)
88) J.A.BADWEY und M.L.KARNOWSKY: Ann.Rev.Biochem. 49, 695 (1980)
89) A.J.SBARRA und M.L.KARNOWSKY: J.Biol.Chem. 234, 1355 (1959)
90) R.C.ALLEN in"Bioluminescence and Chemiluminescence", Hrsg. M.A.deLuca und W.D.McElroy, S. 63, Academic press, New York (1981)
91) R.L.STJERNHOLM, R.C.ALLEN und R.H.STEELE: Infect.Immun. 7, 313 (1974)
92) T.KATO, H.WOKALEK, E.SCHÖPF, H.EGGERT, M.ERNST, E.TH.RIETSCHEL und H.FISCHER: Klin.Wschr. 59, 203 (1981)
93) B.D.CHESON, J.T.CURNUTTE und B.M.BABIOR: Prog.Clin.Immunol. 3, 1 (1977)
94) G.BIOZZI, B.BENACERRAF, C.STIEFFEL und B.N.HALPERN: C.R.Soc. Biol. 148, 431 (1954)
95) G.BIOZZI und C.STIFFEL: Progr.Liver Dis. 2, 166 (1965)
96) R.W.DUTTON und J.D.EADY: Immunology 7, 40 (1964)
97) W.H.MARSHALL, F.T.VALENTINE und H.S.LAWRENCE: J.Exp.Med. 130, 327 (1969)
98) G.WEITZEL, F.SCHNEIDER, A.M.FRETZDORFF, J.DURST und W.D. HIRSCHMANN: Hoppe-Seyler's Z.physiolog.Chem. 348, 433 (1967)
99) D.M.WEIR: "Handbook of experimental Immunology", Vol.II, Chapt. 31.25, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)

100) H.FRIEDMAN, T.W.KLEIN und A.SZENTIVANYI: Immunomodul.Bact. (Proc.Conf.), 165 (1981)
101) B.N.HALPERN, A.R.PREVOT, G.BIOZZI, C.STIFFEL und D.MOUTON: J.Reticul.Soc. 1, 77 (1964)
102) H.GÖING: Klin.Wschr. 40, 441 (1962)
103) L.CAVALLI-SFORZA: "Biometrie,Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik", S. 51, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart (1974)
104) R.D.NELSON, M.J.HERRON, J.R.SCHMIDTKE und R.L.STIMMONS: Infect.Immun. 17, 513 (1977)
105) R.C.ALLEN in "XI.International Congress of Clinical Chemistry", Hrsg. E.Kaiser, F.Gabl, M.M.Müller und M.Bayer, S. 1044, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin-New York (1982)
106) K.WULFF und R.C.ALLEN: "Topics in Biochemistry", in Druck
107) H.STUPPNER und A.VOLLMAR, unveröffentlichte Ergebnisse
108) P.H.LIST: "Arzneiformenlehre", S. 290, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1976)
109) G.FANSELOW: Dissertation Universität München 1982
110) G.LEMPERLE: Plast.reconst.Surg. 45, 435 (1970)
111) G.LEMPERLE und M.REICHELT: Med.Klin. 68, 48 (1973)
112) F.W.OSTENDORF: Suriname Bull. 79, 199 (1962)
113) H.TEPPNER, unveröffentlichte Ergebnisse
114) M.DE MATTO, S.F.DELLE-MONACHE, F.FERRARI und G.B.MARINI-BETTOLO: Il Farmaco 31, 527 (1976)
115) K.KEPLINGER: PCT Int.Appl. WO 82 01, 130
116) M.RAYMOND-HAMET: R.Soc.Biol. 115, 255 (1934)
117) T.CHANG, M.LI, Y.LI, Y.WANG, L.WU, T.LI: Nat.Med.J.China 58, 408 (1978), Ref.C.A. 92, 191363 (1980)
118) M.RAYMOND-HAMET: Arch.Int.Pharmacodyn. 66, 330 (1941)
119) E.PERROT, M.RAYMOND-HAMET und L.MILLAT: Bull.Sci.Pharmacol. 43, 694 (1936)
120) M.HARADA und Y.OZAKI: Chem.Pharm.Bull. 22, 1372 (1974)
121) M.HARADA, Y.OZAKI und H.OHNO: Chem.Pharm.Bull. 27, 1069 (1979)
122) M.HARADA und Y.OZAKI: Chem.Pharm.Bull. 24, 211 (1976)
123) M.GORMAN, R.TUST, G.SVOBODA und J.LE MEN: Lloydia 27, 214 (1964)
124) C.E.RIDSDALE: Blumea 24, 43 (1978)
125) A.ENGLER: "Syllabus der Pflanzenfamilien",Band II, S. 418, Verlag Gebrüder Borntträger, Berlin (1964)
126) J.D.PHILLIPSON und S.R.HEMINGWAY: Lloydia 41, 503 (1978)
127) M.RAYMOND-HAMET: C.R.Acad.Sci. 235, 547 (1952)
128) S.R.HEMINGWAY und J.D.PHILLIPSON: J.Pharm.Pharmacol. 26, 113P (1974)
129) J.TRAVELL: J.Pharm.Sci. 33, 684 (1934)
130) J.D.PHILLIPSON und S.R.HEMINGWAY: J.Chromatogr. 105, 163 (1975)
131) R.MUNIER und H.MACHEBOEUFF; Soc.Chim.Biol. 33, 846 (1951)
132) R.A.HEACOCK und M.E.MAHON: J.Chromatogr. 17, 338 (1965)
133) H.J.HUIZING und TH.M.MALINGRE: J.Chromatogr. 173, 187 (1979)
134) A.H.BECKETT, D.DWUMA-BADU und R.E.HADDOCK: Tetrahedron 25, 5961 (1969)
135) M.HESSE: "Indolalkaloide", Teil I, S. 136, Verlag Chemie, Weinheim (1974)
136) E.J.SHELLARD, J.D.PHILLIPSON und D.GUPTA: Planta med. 16, 436 (1968)
137) W.F.TRAGER, C.M.LEE, J.D.PHILLIPSON, R.E.HADDOCK, D.DWUMA-BADU und A.H.BECKETT: Tetrahedron 24, 523 (1968)

138) J.POISSON und J.L.POUSSET: Tetrahedron Letters 1967, 1919
139) J.C.SEATON, M.D.NAIR, O.E.EDWARDS und L.MARION: Canad.Chem.J. 38, 1035 (1960)
140) N.K.HART, S.R.JOHNS und J.A.LAMBERTON: Chem.Commun. 87 (1967)
141) M.SHAMMA, R.J.SHINE, I.KOMPIS, T.STICZAY, F.MORSINGH, J.POISSON und J.L.POUSSET: J.Am.Chem.Soc. 89, 1739 (1967)
142) J.E.SAXTON: "The Alkaloids", Vol.VIII, S. 59, Hrsg.R.H.F. Manske, Academic press, New York (1965)
143) S.R.JOHNS und J.A.LAMBERTON: Tetrahedron Letters 1966, 4883
144) G.B.YEOH, K.C.CHAN und F.MORSINGH: Tetrahedron Letters, 1966, 931
145) H.ZINNES und J.SHAVEL: J.org.Chem. 31, 1765 (1966)
146) E.J.SHELLARD und J.D.PHILLIPSON: Tetrahedron Letters 1966, 1113
147) A.H.BECKETT, E.J.SHELLARD und A.N.TACKIE: J.Pharmacy 15, 158T (1963)
148) E.J.SHELLARD und M.Z.ALAM: Planta med. 16, 127 (1968)
149) E.J.SHELLARD und M.Z.ALAM: Planta med. 16, 248 (1968)
150) E.J.SHELLARD und M.Z.ALAM: J.Chromatogr. 33, 347 (1968)
151) J.D.PHILLIPSON, N.SUPAVITA und L.A.ANDERSON: J.Chromatogr. 244,.91 (1982)
152) S.EKSBERG, P.-O.LAGERSTRÖM, R.MODIN und G.SCHILL: J.Chromatogr. 83, 99 (1973)
153) K.G.WAHLUND: J.Chromatogr. 115, 411 (1975)
154) Firmenschrift WATERS Assoc.: "Ionenpaarchromatographie" (1980)
155) M.LAVAULT, C.MORETTI und J.BRUNETON: Planta med. 47, 244 (1983)
156) P.TANTIVATANA, D.PONGLUX, S.WONGSERIPIPATANA und J.D. PHILLIPSON: Planta med. 40, 299 (1980)
157) J.D.PHILLIPSON und N.SUPAVITA: J.Pharm.Pharmcacol. 33, Suppl. 13p (1981)
158) E.J.SHELLARD, J.D.PHILLIPSON und D.GUPTA: Planta med. 17, 51 (1969)
159) E.J.SHELLARD und J.D.PHILLIPSON: Planta med. 12, 160 (1964)
160) E.J.SHELLARD und J.D.PHILLIPSON: Planta med. 12, 27 (1964)
161) E.J.SHELLARD, J.D.PHILLIPSON und D.GUPTA: Planta med. 17, 146 (1969)
162) E.J.SHELLARD und P.J.HOUGHTON: Planta med. 20, 82 (1971)
163) E.J.SHELLARD und P.J.HOUGHTON: Planta med. 21, 263 (1972)
164) E.J.SHELLARD und P.J.HOUGHTON: Planta med. 24, 341 (1973)
165) K.JURCIC und T.BREITSAMETER: unveröffentlichte Ergebnisse
166) E.SCHRÖDER, C.RUFER und R.SCHMIECHEN: "Arzneimittelchemie", Band I, S. 387, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1976)
167) A.PROKSCH und M.LE TURDU: persönliche Mitteilungen
168) T.OKUDA, K.MORI und M.SHIOTA: Yakugaku Zasshi 102, 854 (1982)
169) R.I.GERAN: Canc.Chemother.Rep. 3, 17 (1972)
170) R.I.GERAN: Canc.Chemother.Rep. 3, 9 (1972)
171) J.KERHARO und A.BOUQUET: "Plantes Medicinales et Toxiques de la Cote- d'Ivoire-Haute-Volta", S. 140, Vigot Feres-Verlag, Paris (1950)
172) M.KUNST: AHZ 3, 116 (1972)
173) PH.VAN TIEGHEM: J.Botan. 19, 45 (1905)
174) A.TAKHTAJAN: "Die Evolution der Angiospermen", VEB G.Fischer-Verlag, Jena (1957)

175) J.HUTCHINSON: "The Families of flowering Plants", Clarendon press, Oxford (1959)
176) R.WETTSTEIN: "Handbuch der systematischen Botanik", Wettstein-Verlag, Leipzig-Wien (1935)
177) E.M.CHENERY: Kew Bull. 173 (1948)
178) C.MICHALEC: Biochem.Biophys.Acta 19, 187 (1957)
179) E.STAHL und U.KALTENBACH: J.Chromatogr. 5, 351 (1961)
180) P.J.STEVENS: J.Chromatogr. 14, 269 (1964)
181) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER und G.BITTNER: Arzneim.-Forsch. 13, 537 (1963)
182) R.NEU: Naturwissenschaften 44, 181 (1957)
183) M.R.GRIMMETT und E.L.RICHARDS: J.Chromatogr. 20, 171 (1965)
184) L.H.BRIGGS und R.H.LOCKER: J.Chem.Soc. 3136 (1951)
185) K.PAECH und M.V.TRACEY: "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955) Band III,
186) A.R.PATTON und P.CHISON: Anal.Chem. 23, 1683 (1951)
187) J.GREVEL: Dissertation Universität München 1982
188) N.R.FARNSWORTH, N.A.PILEWSKY und F.J.DRAUS: Lloydia 25, 312 (1962)
189) N.R.FARNSWORTH: J.Pharm.Sci. 55, 225 (1966)
190) L.A.ANDERSON, N.S.DOGGETT und M.S.ROSS: Planta med. 32, 125 (1977)
191) R.BRÜNING: Dissertation Universität München 1979
192) R.MUNIER: Bull.Soc.Chim.France 19, 852 (1952)
193) H.P.KAUFMANN und A.K.GUPTA: Chem.Ber. 97, 2652 (1964)
194) E.STAHL und H.KALDEWEY: Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 323, 182 (1961)
195) E.CHARGAFF, C.LEVINE und C.GREEN: J.Biol.Chem. 175, 67 (1948)
196) S.MOORE, D.H.SPACKMANN und W.H.STEIN: Analyt.Chem. 30, 1185 (1958)
197) L.VUATAZ, H.BRANDENBERGER und R.H.EGLI: J.Chromatogr. 2, 173 (1959)
198) K.FREUDENBERG und K.WEINGES: Fortschr.Chem.org.Naturst. 16, 5 (1958)
199) D.G.ROUX: Nature 180, 973 (1957)
200) K.HERMANN in "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe", Vol. 35, S. 73, Hrsg.: W.Herz, H.Griesebach u. G.W.Kirby, Springer-Verlag, Wien-New York (1978)
201) H.GLASL: Dissertation München 1970
202) E.SCHRÖDER, C.RUFER und R.SCHMIECHEN: "Arzneimittelchemie", Band III, S. 10, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1976)
203) K.O.MÜLLER: "Pharmakologie", S. 198, Schwabe u.Co.-Verlag, Basel (1966)
204) Y.KISO, M.TOHKIN und H.HIKINO: Planta med. in Druck
205) Y.KISO, M.TOHKIN und H.HIKINO: J.Nat.Prod., in Druck
206) M.FIEBIG: Dissertation Universität München 1983
207) V.A.NAJJAR und K.NISHIOKA: Nature 228, 672 (1970)
208) S.MATSUURA, A.TAKASAKI, H.HIRATANI, T.KOTERA und S.FUJIWARA: Jpn.Kokai Tokkyo Koho 75 13, 373, Ref.C.A.83 114937 (1975)
209) E.TEUSCHER: "Pharmakognosie", Teil II, S. 257, Akademie-Verlag, Berlin (1970)
210) E.MELCHIOR: Münch.Med.Wschr. 38, 1235 (1971)
211) F.KOSINA und D.TRUKSOVA: Gas.Lek.Ces. 115, 1454 (1976)
212) J.BAUER: unveröffentlichte Ergebnisse

213) A.BAERHEIM: Pharm.Ztg. 113, 1382 (1968)
214) W.FORTH, D.HENSCHLER und W.RUMMEL: "Pharmakologie und Toxikologie", S. 570, B.I.Wissenschaftsverlag, Mannheim-Wien-Zürich (1977)
215) M.C.WANI und M.WALL: J.org.Chem. 34, 1364 (1969)
216) Z.ZEIGLER und S.SCHUGAR: J.Reticul.Soc. 25, 235 (1979)
217) R.KOJIMA: Chem.Pharm.Bull. 18, 2555 (1970)
218) L.Z.LIN, H.WAGNER und O.SELIGMANN: Planta med. 49, 55 (1983)
219) E.HAYASHI: Jpn.Kokai Tokkyo Koho 81 43,210, Ref.C.A. 95, 91202 (1981)
220) M.ZENK, E.ETSCHENBERG und E.GRAF: Europ.Patent Applic. 80107752.0
221) A.VOLLMAR: Dissertation Universität München 1984
222) R.BAUER: Dissertation Universität München 1984
223) C.LUDWIG: Dissertation Universität München, in Vorbereitung
224) H.P.HÖRHAMMER: Dissertation Universität München 1966
225) A.J.VIRTANEN: Angew.Chem. 67, 381 (1955)
226) H.FRIEDRICH und J.HÖHLE: Arch.Pharm. 299, 857 (1966)
227) H.J.OTTE und H.BRANDIS: "Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie", S. 174, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart (1978)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München angefertigt.

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich ganz besonders danken:

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. H. Wagner, für das große Interesse an dieser Arbeit, deren stets großzügige Förderung und für wertvolle Anregungen.

Frau Dr. K. Jurcic, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die großartige, kollegiale Zusammenarbeit bei den pharmakologischen Untersuchungen.

Herrn Professor Dr. A. Bauernfeind, Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität München, für die freundliche Zusammenarbeit bei den mikrobiologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. B. Fichtel, Pharmakologisches Institut der Universität München, für die freundliche Unterstützung bei den statistischen Berechnungen.

Herrn Professor Dr. H. Stickl, Bayrische Impfanstalt, München, Herrn Dr. M. Pezzuto, University of Illinois at the Medical Center, Chicago, und Herrn Professor Dr. W. Haefely, Hoffmann-La Roche, Basel, für die Durchführung weiterer pharmakologischer Untersuchungen.

Herrn Dr. R. Bauer, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die vielen hilfreichen Tips bei der Durchführung der HPLC-Analysen.

Herrn Dr. O. Seligmann für die schnelle und freundliche Durchführung der chemisch-physikalischen Untersuchungen am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Herrn K. Keplinger, Innsbruck, Herrn Dr. M. Ilyas, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Zaria, Nigeria, und der Fa. DHU, Karlsruhe, für die freundliche Überlassung von Drogenmaterial.

Herrn Professor Dr. J.D. Phillipson, School of Pharmacy, University of London und Herrn Professor Dr. S. Sakai, Ciba University, Ciba, Japan, für die bereitwillige Überlassung von Vergleichssubstanzen.

Darüberhinaus möchte ich noch den vielen nicht genannten Kollegen und Institutsangehörigen danken, die in verschiedenster Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

# L E B E N S L A U F

Barbara K r e u t z k a m p
geboren am 28.8.1957 in Marburg/Lahn

| | |
|---|---|
| Eltern: | Dr.phil. Norbert Kreutzkamp, Universitätsprofessor und Irmtraut Kreutzkamp, geb. Berg |
| Schulbildung: | 1964 - 1975 Abitur im Dezember 1975 Gymnasium Othmarschen in Hamburg |
| Studium der Pharmazie: | SS 1976 - SS 1979 Universität Hamburg |
| 2.Prüfungsabschnitt der Pharm.Prüfung: | Oktober 1979 |
| Pharmazie-Praktikum: | November 1979 - April 1980 Endo-Apotheke, Hamburg |
| 3.Prüfungsabschnitt der Pharm.Prüfung: | November 1980 in Hamburg |
| Approbation: | 9.Dezember 1980 |
| Wissenschaftliche Tätigkeit: | 1.Mai 1980 Beginn der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Herrn Professor Dr.H.Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München mit gleichzeitiger Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft. |